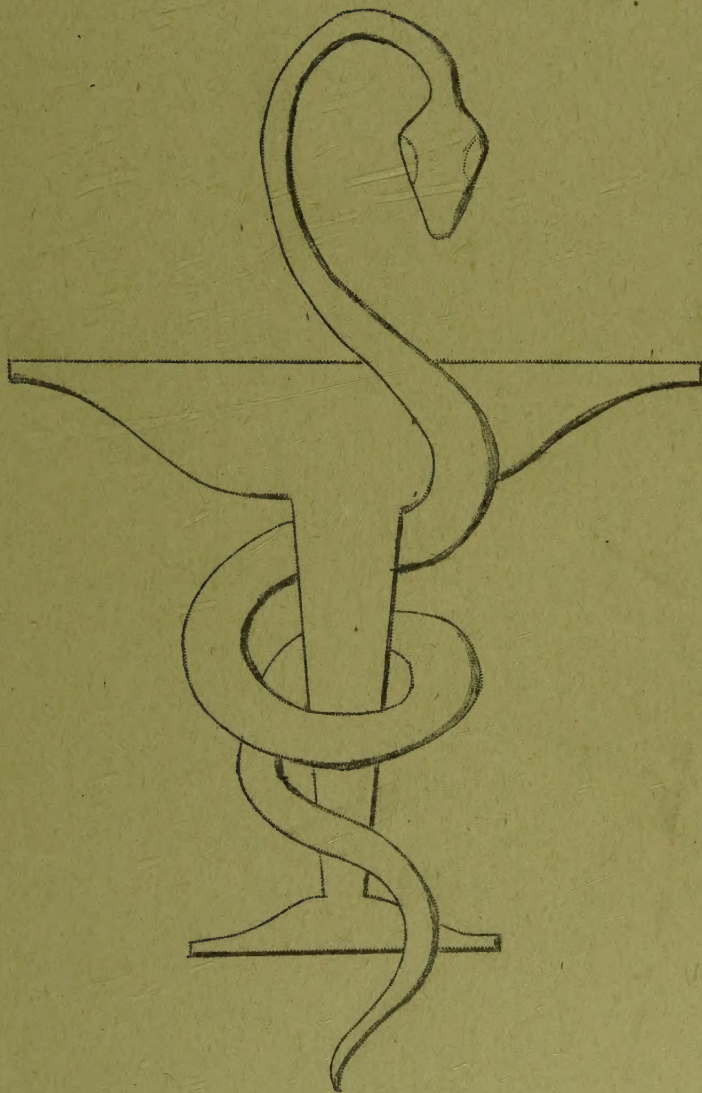


THESE de DOCTORAT d'UNIVERSITE



1949.

THESE de DOCTORAT d'UNIVERSITE

soutenue le 15 Juin 1949

INSCRITE sous le n° 149. - Série U.



FACULTE de PHARMACIE de PARIS

- Administration -

MM. René FABRE, Doyen, O. ,  I.
DELABY, Assesseur, O. ,  I.
G. CUVIER, Secrétaire,  I.

MM.

JEANDEL L., Rédacteur Princ.  A.
QUILLIOT A. Rédacteur

MM.

BUVAT E., Commis.,  A.
Mme ESPINASSE M.L., Commis.
Mle DENNY M., Commis.

- Professeurs -

MM. FABRE, O. ,  I.
DELABY, O. ,  I.
SARTORY, C. ,  I.
PICON, ,  I.
MASCRE, ,  I.
FLEURY, ,  I.
JANOT, ,  I.
CHARONNAT, ,  I.
VALETTE, ,  I.
BEDEL, ,  I.

PARIS,  A.

GUILLOT,  A.
GAUTIER,  I.
RAOUL,  A.
DOMANGE,  I.
CRETE,  A.
COURTOIS,  A.

Toxicologie.
Pharmacie chimique.
Microbiologie.
Chimie minérale.
Botanique.
Chimie biologique.
Pharmacie galénique.
Chimie organique.
Zoologie appliquée.
Législation, Déontologie et
Histoire de la Pharmacie.
Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
Physique.
Chimie analytique.

} Professeurs sans chaire
}

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ,  I.

- Professeurs Honoraires -

MM. DELEPINE, O. ,  I. & LEBEAU, C. ,  I., Membres de l'Institut,
PERROT, C. ,  I., COUTIERE, O. ,  I., BOUGAULT, O. ,  I.,
LUTZ, ,  I., HERISSEY, O. ,  I., LAUNOY, O. ,  I.,
SOMMELET O. ,  I.

- Maîtres de Conférences -

MM. MORETTE,  A.
CAVIER.
LAMBIN (Mlle),  I.
TRUHAUT, ,  I.
MOREAU.
GUY.

Sciences physiques et chimiques.
Sciences naturelles.
Sciences naturelles.
Sciences physiques et chimiques.
Sciences physiques et chimiques.
Sciences physiques et chimiques.

- Chefs des Travaux Pratiques -

MM.	CORRIEZ	☞ I.	Physique
	HARISPE,	Travaux pratiques de 1ère année	Chimie Générale et pharmaceutique
	DEYSSON		Botanique
	GERMAIN		Microbiologie
	GIRARD		Chimie biologique
	MANGEOT		T. P. - 4ème année
	PIETTE		Biologie animale
	RENAULT H.		Chimie analytique

- Institut de Pharmacotechnie et de Pharmacodynamie -

MM.	BARONNET	Pharmacotechnie chimique
	GOUTAREL	Pharmacotechnie galénique
	QUEVAUVILLER	Pharmacodynamie

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER ☞ I.
Bibliothécaires (Melle LAVAUD ☞ A.
(Mme KREHMER

R. L. RICOU

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROCEDES
DE CONCENTRATION DES BACILLES TUBERCULEUX
POUR LEUR RECHERCHE DANS LES CRACHATS

I N T R O D U C T I O N

La recherche du bacille tuberculeux, dans les crachats, a fait l'objet de nombreux travaux, mettant en oeuvre des moyens différents, sans que jusqu'à ce jour, l'une des méthodes proposées ait rallié l'unanimité des laboratoires spécialisés.

Après un examen attentif de tous les travaux traitant de cette recherche, après les multiples essais patiemment renouvelés des techniques utilisées jusqu'à ce jour par nos devanciers et, à la lumière de l'entraînement expérimental que nous avons pu acquérir, grâce à cette discipline, il nous a paru qu'une amélioration positive pouvait être acquise.

L'objet de ce travail est de proposer une méthode nouvelle pour la recherche du bacille de KOCH dans les crachats. Comme cette technique, fondée sur celle de FRIGIMELICA, fait appel à un certain nombre de données physico-chimiques, il nous a paru indispensable, pour donner à cet exposé toute la clarté désirable, de consacrer au crachat et au bacille tuberculeux une étude succincte qui sera limitée à de simples considérations générales.

Pour notre étude, nous avons donc suivi le plan ci-dessous :

1 - Le crachat tuberculeux : ses particularités.

2 - Le bacille tuberculeux : propriétés physiques et constitution chimique.

3 - Recherche directe : bref aperçu des méthodes de coloration et de la méthode par fluorescence microscopique.

4 - Technique personnelle d'étude comparative des méthodes de concentration du bacille tuberculeux présent dans les crachats.

5 - Exposé des procédés d'homogénéisation les plus utilisées; leur critique; tableaux comparatifs des résultats obtenus.

6 - Méthode de concentration proposée : son principe, ses résultats.

7 - Conclusions.

Avant de passer à l'exposé de nos recherches bibliographiques et expérimentales, nous tenons à adresser un souvenir respectueux et reconnaissant à la mémoire de Monsieur le Professeur J. REGNIER qui avait bien voulu s'intéresser à notre travail et nous avait inscrit à son laboratoire.

Nous ne saurions trop remercier Monsieur le Doyen A. SARTORY d'avoir bien voulu nous permettre de poursuivre nos recherches sous sa haute direction. Ses conseils et ses encouragements ont été pour nous d'un précieux secours. Nous lui adressons l'expression de nos sentiments reconnaissants pour avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de notre thèse.

Nous remercions également avec gratitude Monsieur le Professeur FLEURY et Mademoiselle S. LAMBIN, maître de conférences, d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Monsieur le Professeur M. GUERBET, après nous avoir proposé le sujet de ce travail, nous a donné toutes facilités matérielles pour le réaliser. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de toute notre profonde reconnaissance pour ses conseils et son enseignement.

Monsieur QUEVAUVILLER, Chef des travaux pratiques de Pharmacodynamie, nous a guidé dans l'élaboration de notre

thèse; alors qu'il était encore Assistant du Laboratoire de Microbiologie, il n'a cessé de nous conseiller et nous lui en exprimons notre profonde gratitude.

Notre confrère J. BESSE nous a bien souvent aidé et encouragé; qu'il veuille croire à nos sentiments de respectueuse reconnaissance.

Enfin, nous ne saurions oublier notre ami J. SEHET et Melle G. DEBRAY notre fiancée qui nous ont aidé à mener à bien ce travail; qu'ils trouvent ici l'expression de nos affectueux sentiments.

CHAPITRE I

LE CRACHAT TUBERCULEUX

Nous croyons nécessaire, au début de l'étude rapide du crachat, de préciser expressément que le fait de ne pas trouver, même après la recherche la plus minutieuse, de bacille tuberculeux dans cet "exsudat", ne saurait infirmer le diagnostic de tuberculose. Dans ce cas alors, cette recherche doit se poursuivre par l'inoculation au cobaye, ce qui constitue un moyen à résultat différé.

Rappelons que l'on rencontre généralement dans les crachats, en dehors des bactéries, un certain nombre d'éléments cellulaires dont les principaux sont : des cellules bronchiques, des cellules de l'épithélium alvéolaire, des leucocytes, des hématies, des fibres élastiques, des travées de mucus, etc ...

C'est en raison de ces considérations qu'un certain nombre de savants se sont préoccupés de trouver, dans les éléments constitutifs du crachat, un test spécifique qui, en l'absence du bacille, aurait eu la même signification pathognomonique.

Ainsi d'après A. CALMETTE (6), WOLFF-EISSNER appelle l'attention sur la présence dans le crachat de lymphocytes dont l'abondance lui paraît être un signe révélateur de la tuberculose pulmonaire à son début, alors que l'on ne trouve pas de bacilles de KOCH, WIDAL, SICARD et RAVAUT ont établi de véritables règles dans l'examen cytologique des résultats de leurs recherches. Ils ont signalé la très grande prédominance des lymphocytes tandis que les polynucléaires neutrophiles tendent à disparaître. Pour ces savants, ce caractère est constant et on peut affirmer la nature tuberculeuse de tout épanchement dans lequel on trouve une abondante lymphocytose.

Pour WENDENBERG, un crachat suspect peut être considéré comme tuberculeux avec une assez grande certitude lorsqu'il contient plus de 5 p. 100 d'éosinophiles. En 1909, H. ROGER, LEVY-VALENSI et D. MIKHAILOFF, après avoir recherché méthodiquement l'albumine dans les crachats, attirèrent l'attention des cliniciens sur sa présence presque constante dans la tuberculose ouverte. Melle WOURDMANN affirme que la variété d'albumine qui prédomine dans l'expectoration a une grande importance dans le pronostic. La Prédominance de la sérine s'observe dans les cas à évolution rapide, tandis que la globuline en excès prédomine dans les cas favorables ayant tendance à la guérison.

CALMETTE (6) avait déjà signalé que la présence de fibres élastiques a été longtemps considérée comme un signe pathognomonique de tuberculose.

Dosage de l'albumine, de la sérine, recherche des fibres élastiques, numération des éosinophiles et des lymphocytes, tel est le cadre dans lequel s'est limité le champ des investigations en vue d'un test spécifique de la tuberculose. Jusqu'à ce jour, les hypothèses émises par les savants à ce sujet n'ont été retenues que comme présomptions. Un fait subsiste néanmoins comme conséquence de ces tentatives, c'est l'importance entrevue par ces chercheurs que peut et que doit avoir la connaissance complète de la composition intime du crachat. C'est pourquoi on peut regretter que les recherches dirigées dans ce sens n'aient été jusqu'à ce jour que fragmentaires. On ne peut manquer de reconnaître qu'on ne trouve pas dans la bibliographie spécialisée une analyse complète synoptique des crachats telle que nous les trouvons pour le sang et pour l'urine.

Est-il excessif de croire qu'une analyse poussée aussi loin, dans tous ses aspects physico-chimiques, apporterait une contribution importante pour une plus grande clarté de cette question ?

Le crachat, exsudat pathologique de l'organisme, est le résultat d'une inflammation; par une connaissance plus complète de sa constitution ne pourrait-on pas mieux encore entrevoir quelle déviation imprime au métabolisme de l'organisme le bacille de KOCH ?

C H A P I T R E I I

LE BACILLE TUBERCULEUX

La présence du bacille de KOCH étant considérée comme un signe pathognomonique indiscutable de la tuberculose, sa recherche et son identification s'avéraient indispensables. C'est dans ce but que de nombreux procédés ont été proposés aussi bien pour sa coloration que pour la facilité de sa recherche. Si le choix des différentes méthodes de coloration s'est à peu près unanimement fixé sur le procédé de ZIEHL à la fuschine phéniquée, il n'en est pas tout à fait de même pour les méthodes de recherche. Une grande variété de procédés ont été proposés dont la plupart utilisent la différence entre la densité spécifique du bacille et celle du milieu qui le renferme.

Signalons que le poids du bacille de KOCH est de un quarante millionnième de milligramme; sa densité varie de 1.004 à 1.080 et sa longueur de 0,5 à 8 μ .

Différence de densités, coloration, font de cette recherche une étude ressortissant de données physico-chimiques; mais nous nous proposons d'aller plus loin dans l'étude si importante de ce bacille, et d'abord de le

situer dans la systématique des êtres organisés. Par certains de ses caractères, il paraît appartenir à la classe des MYCO-BACTERIACEES, notamment en tenant compte, dans ses constituants, de la présence d'un diholoside : le tréhalose, que l'on signale aussi dans le seigle ergoté. La surface de ses micelles protoplasmiques est imprégnée de cire, dérivée du tréhalose, ce qui lui confère sa propriété alcool-acido-résistante, mais cette acido-résistance disparaît sous l'action d'un ferment hydrolysant provenant des cellules lymphatiques, lequel a la propriété de détruire le bacille tuberculeux. Il n'est pas nécessaire, d'ailleurs, d'extraire cette substance cireuse pour faire disparaître l'acido-résistance : un broyage parfait des corps bactériens peut suffire.

On a pu, d'après J.V. HARISPE (22), isoler dans le bacille de KOCH des esters phosphorés liés à des sucres et à des protéines, et par scission enzymatique ou chimique de ces nucléo-protéïdes, on a extrait un acide nucléinique exempt de protéïnes, l'acide tuberculinique, constitué par la combinaison dans sa molécule d'une molécule d'acide phosphorique, d'un sucre réducteur, un pentose : la désoxy-ribose, et d'une base purique ou pyrimidique. La connaissance de l'acide tuberculinique, en raison de la présence d'une base pyrimidique chez le bacille de KOCH, --

car elle constitue une exception en botanique, - situe ce bacille à la limite du règne végétal et du règne animal. Ce fait est remarquable, car les autres bacilles acido-résistants non pathogènes ne renferment pas d'acide tuberculinique.

L'analyse chimique révèle la présence de soufre, potassium, calcium, silice, chlore, magnésium et phosphore. Les cendres renferment un quart de leur poids de sulfates et 43 % de phosphates.

Le bacille tuberculeux, au cours de son évolution, présente des granulations cytoplasmiques considérées comme l'unité vivante infectante et régénératrice de la forme bacillaire acido-alcoolo-résistante. En 1922, VAUDREMER (50) annonçait comme possible le passage au travers de la Bougie Chamberland L2 de formes atypiques non alcoolo-acido-résistantes. En 1923, les faits publiés par le même auteur mettent en lumière le phénomène de la filtrabilité de l'ultra-virus tuberculeux. Les filtrats de culture renferment des éléments qui, quoiqu'invisibles, sont virulents et tuberculigènes (FONTES (17)). La connaissance de cette phase ultra-microscopique dans la cyclogénie du bacille de KOCH permet d'entrevoir ce polymorphisme bactérien et d'apercevoir les modalités multiples des réactions opposées.

par l'organisme infecté, à chacun des éléments bactériens ou à chacune des phases de leur développement.

Nous en présentons ici une rapide énumération : un fractionnement des protéines très voisines par leur contenu en amino-acides met en évidence l'absence presque complète de globulines à haut poids moléculaire et la présence de deux ou trois albumines qui seraient responsables de certains phénomènes allergiques et auraient un pouvoir antigénique distinct. Après hydrolyse totale, la matière réductrice est de 6 % pour le bacille tuberculeux humain; elle n'est que de 1 % pour les autres bacilles acido-résistants. Cette matière réductrice provient d'un polysaccharide composé de galactose, de ~~dar~~arabinose, d'inositol et glucosamine, et en partie d'un glucide neutre, le manninositose lié au phosphatide du bacille de KOCH.

Nous devons à MACHEBOEUF l'identification des phosphatides; l'acide mannose-^{/l'acide mannose-inosito-phosphorique/}glycéro-phosphorique, /^{duquel on peut} détacher le triholoside déjà cité; le manninositose, constitué de deux molécules de mannose et d'une molécule d'inositose; ces deux acides seraient combinés à l'état de sels de magnésium, de calcium et de sodium et ils seraient responsables de l'activité haptène de fixation de l'alexine.

Le bacille de KOCH est remarquable par sa teneur très élevée en lipoides, qui atteint pour la souche VALLEE et

le B.C.G. un quart à un tiers du poids des bacilles desséchés. Ces lipides, par leur point de fusion élevé et leur faible indice d'iode se différencient des huiles végétales et des graisses animales, mais se rapprochent des cires animales ou végétales; Ils ont, fait à signaler, une activité folliculinique très faible et on admet qu'il existe peut-être des traces de substances cestrogènes du type phénanthrénique.

La plus grande partie des lipides du bacille de KOCH sont des esters d'acides gras à très longue chaîne avec des alcools et avec le tréhalose. Ces alcools sont les suivants

le α -OCTADECANOL-2 $C_{18}H_{38}O$ P.F. = 76°

le α -EICOSANOL-2 $C_{20}H_{42}O$ P.F. = 62°

le PHITOCEROL $C_{35}H_{72}O_3$ P.F. = 73°

Les lipides du bacille tuberculeux et particulièrement les acides gras spécifiques, inhibent le pouvoir phagocytaire des leucocytes.

les quatre principaux acides gras sont :

- l'acide tuberculostéarique $C_{19}H_{38}O_2$ P.F. = 10° inactif
sur la lumière polarisée

- l'acide phthioïque $C_{26}H_{52}O_2$ P.F. = 26° dextrogyre,

- l'acide mycocérosique $C_{30}H_{60}O_2$ P.F. = 27° lévogyre,
cireux, amorphe,

- l'acide mycolique $C_{88}H_{174}$ ou $174O_4$ P.F. = 55° dextrogyre.

A signaler la présence d'un pigment naphthalénique, le PHTIOCOL ou METHYL-2 hydroxy-3 naphthoquinone; il est jaune, à fluorescence violette et donne des sels alcalins rouges, solubles dans l'eau avec une fluorescence verte.

A. SARTORY et J. MEYER (40) ont décelé à partir du bacille tuberculeux, souche VALLEE, une lipase stable dans le liquide de culture hydro-glycériné, qui se différencie des lipases pancréatiques par son action décroissante sur divers acides gras. Ces auteurs (41) constatent que cette lipase pancréatique modifie la morphologie du bacille de KOCH et lui fait perdre ses propriétés d'acido-résistance (cultures à 40, et 50 % d'extrait lipasique), mais après repiquage sur jus de pomme de terre neuf, la jeune culture reprend immédiatement les propriétés originales du bacille tuberculeux.

Signalons d'autres diastases : oxydase agissant sur les polyphénols, et sept peptidases dont quatre sont pathogènes pour l'homme. MAIGNON a étudié l'action des peptones dérivées des corps bacillifères sous l'influence de la pepsine, peptones qui constitueraient de véritables poisons tuberculeux de l'amaigrissement, de l'hyperthermie et de la lésion spécifique : nécrose et fibrose. De même les nucléoprotéides et les phospholipides du bacille de KOCH injectés dans les veines engendrent l'hyperthermie, tandis que in-

jectés dans le muscle ou sous la peau, elles provoquent la fibrose ou la nécrose des tissus. De plus, les injections d'acide tuberculo-stéarique ou d'acide phtioïque provoquent des lésions ressemblant à de réelles lésions tuberculeuses.

On voit ainsi que la constitution chimique du bacille tuberculeux se précise de plus en plus. Ces résultats n'ont pas qu'un intérêt documentaire; en effet, dans ces dernières années, ainsi que HARISPE l'a parfaitement mis en lumière, on a trouvé certaines analogies entre les constituants du bacille et les substances qui en provoquent la bactériostase, comme la Streptomycine. La connaissance des produits constitutifs du bacille de KOCH apportera peut-être la clé de la chimiothérapie de l'infection tuberculeuse.

CHAPITRE III

RECHERCHE DIRECTE ET METHODES DE COLORATION

DU BACILLE TUBERCULEUX

La méthode directe, toujours employée comme "trilage" n'est qu'une coloration après séchage et fixation.

Nous avons successivement essayé les diverses techniques de coloration exposées dans les manuels; elles font appel à la fuchsine phéniquée de ZIEHL comme colorant du bacille et diffèrent entre elles par les agents de décoloration et par la recoloration du fond de la préparation.

Les décolorants autres que l'acide azotique et l'acide chlorhydrique, - tels que le bicarbonate de soude en solution à 10 % dans l'alcool à 70° (MULLER (33)), la solution de sulfite de soude (SCHULTE-TIGGES(42)), l'eau oxygénée à 12 volumes additionnée de soude, etc ... ne donnent que des résultats nettement inférieurs et la décoloration des microbes autres que le bacille de KOCH risque d'être insuffisante. Pour notre part, nous nous en sommes tenus à l'acide azotique à 15 % qui nous a toujours donné entièrement satisfaction.

Comme recolorants du fond, nous avons successivement essayé le bleu de méthylène en solution aqueuse à 1 % ou le bleu phéniqué de KUHNE dilué dans l'eau, habituellement employés, ceux-ci donnent des préparations trop colorées et qui manquent de transparence. Le vert malachite (50 parties de solution aqueuse saturée pour 100 parties d'eau distillée pendant 30 secondes (KONRICH (29)) donne un fond nettement défavorable à l'observation. Le fond brun obtenu par l'iode en solution alcaline (KRONBERGER (30)) ou en solution chlorhydrique (PORGES (35)), par le permanganate de potassium à 0,10 % (WEISS (52)), ne tranche pas suffisamment sur le rouge du bacille de KOCH.

Nous avons eu également l'occasion d'employer la méthode d'OSOL (53) ou méthode du fond noir. On colore le frottis à chaud par la fuchsine phéniquée, on décolore par un mélange acide sulfurique-acide nitrique et on fait agir de l'ammoniaque ou de l'hyposulfite de soude à 5 %. Les bacilles tuberculeux apparaissent en points brillants sur fond noir. Les résultats obtenus sont excellents, mais l'emploi de cette méthode exige de la part de l'opérateur une grande habitude, car les poussières et les petits cristaux captent la lumière et peuvent passer pour des bacilles de KOCH. Les risques d'erreur sont donc relativement nombreux.

Pour nous, la coloration du fond qui se prête le mieux à l'observation est, sans nul doute, celle obtenue par la méthode de KARL SPENGLER (44). Il faut prendre soin au cours de l'opération de décolorer la préparation par l'acide azotique à 15 % jusqu'à obtention d'une teinte mauve seulement, on recolore le fond par un mélange de solution saturée d'acide picrique et d'alcool à 90° à parties égales. Les préparations ainsi obtenues sont faciles à lire; elles sont pâles, claires, et d'une très grande transparence même avec une épaisseur relativement élevée de crachat. En outre, le fond jaune pâle convient admirablement à l'observation et la couleur rouge des bacilles tuberculeux tranche nettement; ainsi la fatigue pour l'opérateur est réellement moindre.

Nous ne pouvons passer sous silence une méthode récente (25) (27) (3) (11) (20), la recherche du bacille de KOCH par microfluorescence.

Le principe de cette méthode consiste à imprégner les bacilles tuberculeux de substance fluorescente (solution d'auramine à 1 %) et à éliminer devant la rétine tout rayonnement autre que celui des bacilles de KOCH; on active la fluorescence de ces derniers par les rayons ultra-violets ou voisins des ultra-violets; il faut, en outre, éviter dans le système optique employé toute matière fluorescente.

Le matériel consiste en :

- 1 - Une source lumineuse punctiforme puissante (lampe 6 volts - 5 ampères).
- 2 - Un écran bleu placé entre la lampe et le microscope, fixé sur le porte-lampe; cet écran laisse passer les rayons entre 334 - 480 Å .
- 3 - Un microscope ordinaire (avec verres et colles non fluorescents)
- 4 - Un filtre jaune orangé, placé entre l'oculaire et l'œil (sur l'oculaire) pour retenir tout rayonnement primaire bleu (ce qui protège l'observateur) et ne laisser passer que la lumière jaune des bacilles de KOCH.

La technique est la suivante :

- 1 - Fixer le frottis par la chaleur.
- 2 - Colorer à froid 10 à 15 minutes suivant l'épaisseur du crachat avec une solution d'auramine à 1 %.
- 3 - Laver 2 à 3 minutes.
- 4 - Décolorer avec le mélange

Acide chlorhydrique	4 cm ³
Chlorure de sodium	4 cm ³
Alcool à 95%	1000 cm ³
- 5 - Laver rapidement et sécher.
- 6 - Opérer dans une pièce obscure et employer l'éclairage maximum avec un petit grossissement et se servir de

l'objectif à immersion avec une huile de cèdre non fluorescente.

Les bacilles tuberculeux apparaissent en bâtonnets jaune d'or très brillants se détachant sur un fond presque noir. D'après HAUDUROY (23) (24), la méthode n'est ni plus ni moins sûre que le ZIEHL classique, mais elle est plus rapide.

C H A P I T R E I V

TECHNIQUE PERSONNELLE D'ETUDE COMPARATIVE DES METHODES DE CONCENTRATION DU BACILLE TUBERCULEUX A PARTIR DES CRACHATS

Nous avons commencé par entreprendre notre étude sur les crachats d'un laboratoire d'analyses spécialisé; mais il nous est rapidement apparu que cette méthode ne nous permettrait pas de faire des comparaisons rigoureuses entre les différentes techniques de concentration : en effet, tantôt on nous soumettait des crachats non bacillifères, tantôt des crachats contenant une quantité considérable de bacilles qu'il nous était impossible de dénombrer.

Aussi avons-nous pensé à utiliser comme "témoin" un crachat-type dans lequel il nous aurait été possible de "titrer" en quelque sorte, ou plus exactement de dénombrer la quantité de bacilles tuberculeux contenus dans un volume déterminé de crachat.

Voici comment nous avons procédé :

Nous choisissons un crachat riche en bacilles tuberculeux (50 à 70 parchamp de microscope à l'examen direct). D'autre part, nous prenons un crachat ne contenant aucun bacille de KOCH. Dans un mortier stérilisé, nous pesons

5, 10, 15 ou 20 g. de crachat sans bacille. A l'aide d'une pipette Pasteur, nous prélevons une goutte du crachat riche en bacilles que nous ajoutons à ces 5, 10, 15 ou 20 g. de crachat dépourvu de bacilles. Avec un pilon également stérilisé, nous mélangeons soigneusement pendant 5 minutes.

Par ce procédé, nous obtenons ainsi des crachats dont nous connaissons approximativement le nombre de bacilles tuberculeux par champ de microscope.

Sur ce crachat "témoin" ainsi préparé, nous faisons tout d'abord un examen direct sans concentration préalable; ensuite, nous pratiquons les différentes méthodes d'homogénéisation sur des dilutions de plus en plus grandes, ce qui constitue un test de la précision et de la sensibilité de chaque méthode.

Nous notons les chiffres obtenus et nous comparons enfin les résultats.

Pour l'examen (oculaire : 2, objectif à immersion : 1/15) nous parcourons la lame en partant du haut à droite suivant des bandes parallèles, de manière à ne pas compter deux fois les mêmes bacilles; nous notons le nombre de bacilles de KOCH contenus dans 50 champs de microscope. Pour chacune des dilutions : (1 goutte pour 5 g., 1 goutte pour 10g., 1 goutte pour 15 g., 1 goutte pour 20 g.) nous avons fait 24 examens et nous avons réuni les résultats obtenus en plusieurs tableaux (Tableaux I - II - III - IV - voir

pages suivantes).

C'est de la comparaison de ceux-ci que nous est apparue la meilleure méthode d'homogénéisation, sur laquelle nous avons porté notre effort d'amélioration.

CHAPITRE V

METHODES D'HOMOGENEISATION

ETUDE COMPARATIVE

Lorsque l'expectoration, examinée par la coloration directe, n'a pas révélé la présence de bacilles de KOCH, on a recours aux méthodes improprement dites, d'homogénéisation, et qu'il vaudrait mieux appeler méthodes de concentration. Elles sont très nombreuses : quelques-unes seulement présentent une réelle valeur pratique. Nous nous bornerons à les citer, car la plupart n'ont aucun intérêt pour les recherches courantes.

Les unes utilisent les produits alcalins divers : borate de sodium, acide borique, ammoniacque, eau de chaux, chlorure mercurique additionné de chlorure de sodium, hypobromite de sodium, carbonate de sodium, etc ...; les autres emploient des réactifs à base d'hypochlorites; anti-formine, histoluol, eau de Javel, etc ...; d'autres méthodes sont basées sur l'attaque des crachats par la lessive de soude, puis la centrifugation (BIEDERT, PHILIBERT et BEZANCON, FONTES) ou par la lessive de soude et l'éther

sulfurique (COURATTE, ARNAUD) ou la ligroïne (Guy LAROCHE et VIRMEAUX) ou le chloroforme (FOUREST) ou l'acétone (RONCHESE); d'autres techniques enfin emploient les produits les plus divers : acide phénique, pyridine, et même manne en larmes, etc ... (32).

Nous avons également essayé les méthodes de digestion artificielle des crachats par la pancréatine (SPENGLER 45)), par la papaine (SEDALIAN, BERTOYE et CARRAZ (43)), par la bile pure (CALMETTE (6)), par la bile iodée (GRESEZ et BERNARD (21)), par le suc gastrique fluoré (JOUSSET (26)).

Nous avons aussi utilisé l'autolyse des crachats à la température ordinaire (SABRAZES (39)), ou avec addition de glycérine (STEICH et PIETSCH (46)), ou la température de 37° (PHILIBERT), ou à haute température de 120° (DESPEIGNES).

La plupart de ces méthodes ne nous ont donné que des résultats médiocres et incertains. Aussi, nous sommes-nous finalement borné à l'examen des méthodes courantes qui présentent les avantages suivants :

- a) - Sûreté et constance dans les résultats,
- b) - Emploi d'un matériel simple restreint,
- c) - Rapidité d'exécution.

Classification des principales méthodes d'homogénéisation.-

Signalons, tout d'abord, une méthode récente : celle des mousses (8)(13) qui présente un réel intérêt.

La méthode du moussage-essorage est basée sur le fait que le bacille de KOCH n'est pas mouillé par des liquides aqueux en raison de son enveloppe lipidique, la mousse multipliant les surfaces de séparation de la phase liquide et de la phase gazeuse; le bacille de KOCH se place à l'interface air-liquide du côté de l'air. La presque totalité des bacilles tuberculeux se retrouve dans un liquide de rupture de mousse. Cette méthode a été appliquée avec succès à la recherche du bacille de KOCH dans les crachats par M. CRUVEILHIER (9).

T e c h n i q u e

L'expectoration est transvasée dans une capsule de porcelaine stérile. On ajoute une fois et demie le volume de soude N/10. On chauffe sans aller jusqu'à l'ébullition sur une veilleuse de Bunsen en agitant jusqu'à disparition des grumeaux. On ajoute X à XL gouttes d'alcool absolu suivant le volume du crachat. On verse ensuite dans un bécher stérile de 250 à 500 cm³ dans lequel on a mis préalablement 200 cm³ d'eau distillée. On remue à l'aide d'un agitateur également stérile. Le moussage s'effectuant en présence de papier de tournesol.

On met le bécher au bain-marie à 45° pour faciliter le moussage, on ajoute des substances tensio-actives, le plus souvent de 2 à 8 cm³ de gélatine bactériologique à 15 %. La température de 45° sert à éviter la coagulation de la gélatine. On laisse refroidir au-dessous de 25°, température critique au-dessus de laquelle la mousse ne se formerait pas.

Description de l'appareil utilisé :

Le bécher contenant l'expectoration est surmonté d'un tube en verre pyrex en forme de trompette de 30 cm. de haut, dont l'extrémité inférieure évasée plonge de 1 à 2 cm. dans le liquide. La mousse monte dans ce tube et s'y essore : elle arrive à l'extrémité supérieure recourbée, on la rompt à cet endroit par une trace d'alcool octylique ou d'acétone amenée par un fil de platine flambé. On recueille le liquide de rupture de mousse dans un tube à centrifuger stérile. Il est important de stériliser l'appareil à 200° pendant plus de deux heures afin de détruire les bacilles de KOCH qui pourraient rester collés aux parois au cours d'une précédente opération.

La production de bulles est réalisée à l'aide d'un gaz comprimé quelconque (contenu dans une bouteille en acier et détendu par mano-détendeur) qui arrive dans le bécher

par un tube capillaire. Pour la bonne marche de l'opération, ces bulles doivent être fines et nombreuses de manière à assurer le brassage du liquide. On règle le détendeur de façon que la hauteur de la mousse ne dépasse pas celle de l'appareil utilisé. Lorsque la mousse atteint la hauteur des trois quarts de la trompe, on règle le détendeur de façon qu'elle reste stationnaire deux à trois minutes afin de la laisser s'essorer. On ne fait pas de frottis, mais on étale à l'aide d'une pipette Pasteur le moussat qui renferme un peu de gélatine. On fixe par alcool-éther et on colore par les méthodes habituelles.

Cette technique donne des résultats positifs dans de nombreux cas où les méthodes habituelles échouent, mais elle exige un appareillage particulier dont l'emploi demande une longue pratique et qui n'est pas encore courant dans les laboratoires.

Passons maintenant aux diverses méthodes couramment utilisées; c'est sur l'étude de celles-ci qu'a porté l'essentiel de notre effort.

Ces méthodes comprennent, toutes, deux temps bien distincts :

a) - Homogénéisation proprement dite, qui consiste à fluidifier le crachat constitué par la mucine et la fibrine coagulée, à l'aide d'un liquide alcalin ou de la chaleur

(auto-digestion).

b) - Concentration des bacilles, qui peut s'effectuer de plusieurs manières :

1/ par centrifugation ou simple sédimentation et récolte du culot (Techniques de PHILIBERT et BEZANCON, à l'antiformine, à l'hypobromite de sodium, à l'autoclave à 37°, etc ...).

2/ par centrifugation et rassemblement des bacilles à la surface de séparation de deux liquides non miscibles (Méthode de Carlo FRIGIMELICA, etc ...).

3/ sans centrifugation et par agitation avec un liquide de densité très différente de celle du crachat (Méthodes à la ligroïne de LAROCHE et VIRMEAUX, à l'acétone de RONCHESE, etc ...).

De l'exposé du principe de l'homogénéisation, ressort l'importance primordiale de la notion de densité, tant de celle du bacille tuberculeux que celle du crachat. D'après BEZANCON, PHILIBERT et CASTINEL (5), la densité de l'homogénéisation varie de 0,990 à 1,120. Selon DILG et NEBEL (12) la densité du bacille tuberculeux peut aller de 1,004 à 1,080. Il faut obligatoirement abaisser la densité du crachat homogénéisé au-dessous de 1,004 pour concentrer les bacilles dans le culot de centrifugation. Il est donc indéniable que la densité constitue le critère de la valeur de chaque méthode d'homogénéisation.

Voyons donc, en détail, ces différentes techniques avec leurs avantages et leurs inconvénients; nous ferons suivre leur exposé de tableaux comparatifs des résultats obtenus avec chacune d'elles. Ceux-ci seront ensuite soumis au calcul statistique pour nous rendre compte de l'importance de leur dispersion, ce qui nous aidera à juger de la valeur de chaque méthode.

Nous examinerons successivement :

- 1 - La méthode de PHILIBERT et BEZANCON,
- 2 - La méthode à l'antiformine,
- 3 - La méthode d'autolyse à l'étuve à 37°,
- 4 - La méthode à la ligroïne de LAROCHE & VIRMEAUX
- 5 - La méthode à l'acétone de RONCHESE,
- 6 - La méthode à l'hypobromite de sodium,
- 7 - La méthode de DESPEIGNES,
- 8 - La méthode de FRIGEMELICA.

I - METHODE DE PHILIBERT & BEZANCON

La méthode de PHILIBERT & BEZANCON (4) (34) est, sans nul doute, la plus employée à l'heure actuelle. La fluidification est obtenue par les alcalis à chaud qui solubilisent la fibrine; pour collecter les bacilles tuberculeux, on abaisse la densité du liquide par addition d'une certaine quantité d'alcool à 50°, qui ne coagule pas les albumines comme l'alcool absolu. La densité du bacille de

KOCH étant, nous l'avons vu, de 1,004 à 1,080 (14), il faut abaisser la densité du liquide homogénéisé au-dessous de 1,000 de façon à recueillir les bacilles au fond du tube après centrifugation.

Technique :

- 1 - Dans une capsule de porcelaine, mettre 2 cm³ de crachat.
- 2 - Ajouter 20 cm³ d'eau distillée stérile et 10 gouttes de lessive de soude.
- 3 - Chauffer jusqu'à ébullition douce pendant 10 minutes au bain-marie; arrêter lorsque le crachat est devenu limpide et homogène; laisser refroidir et remplir un tube à centrifuger aux trois quarts; ajouter un quart d'alcool à 50°.
- 4 - Centrifuger une heure, décanter et étaler le culot que l'on colore par la méthode habituelle.

Critique :

Dans l'homogénéisation des crachats, la notion de densité revêt une particulière importance; il faut donc prendre la densité du mélange à l'aide d'un petit densimètre, car rien ne prouve que la quantité d'alcool ajoutée est suffisante pour amener la densité au-dessous de 1,000.

En outre, la dilution au dixième nuit à la précision de la méthode car le culot de centrifugation est minime. De plus, cette technique exige de nombreuses manipulations de

verrerie, ce qui risque d'introduire des bacilles acido-résistants, autres que le bacille de KOCH, dans l'expectoration examinée; il est donc nécessaire d'employer une verrerie et de l'eau stérilisées. Un autre inconvénient réside dans les dangers de contamination dus à la multiplicité des opérations qu'exige cette méthode.

Bref, si les résultats obtenus ne présentent pas une grande dispersion (de 18 à 25 % d'erreur sur la moyenne), il nous est arrivé de ne pas trouver beaucoup plus de bacilles qu'à l'examen direct. (Voir tableaux comparatifs et calculs des erreurs).

II - METHODE A L'ANTIFORMINE

Cette méthode, due à UHLENHUTH (49), précisée par TECO (47), a de grandes analogies avec la précédente; elle en diffère surtout par le choix de l'agent de fluidification.

L'antiformine est un mélange d'hypochlorite de chaux et de lessive de soude; une formule courante de préparation est la suivante :

(Chlorure de chaux	215 g.
(Lessive de soude	286 g.
(Eau distillée	2.000 g.

Elle titre ainsi 1,80 % de chlore.

GIRARD et DE LANNOISSE emploient l'eau de Javel pure (19).

CORDONNIER (7) utilise la liqueur de Labarraque

concentrée ou histoluol que l'on prépare en mélangeant les 2 solutions suivantes :

a) - Chlorure de chaux	50 g.
- Eau distillée	500 cm ³
b) - Carbonate de soude	100 g.
Eau distillée	250 cm ³

On complète le mélange à un litre avec de l'eau distillée.

Notons que l'action de ces derniers réactifs est moins rapide que celle de l'antiformine.

TECHNIQUE de TECON

- 1 - Dans un ballon, mettre un volume de crachat et deux volumes d'antiformine à 20 %. Agiter.
- 2 - Ajouter un volume égal d'alcool à 60° pour abaisser la densité du mélange et empêcher la formation de mousse pendant l'agitation. Agiter fortement pendant deux ou trois minutes et laisser en contact deux heures.
- 3 - Centrifuger 30 minutes, prélever le culot et étaler sur lame.

Critique :

L'exécution de cette méthode est assez longue et demande plus de trois heures. On peut lui faire les mêmes reproches qu'à la technique de PHILIBERT & BEZANCON : non détermination exacte de la densité du mélange par rapport à celle du bacille, manipulations nombreuses, trop grande

dilution du crachat. En général, les résultats obtenus sont inférieurs à ceux de la méthode précédente (Voir tableaux comparatifs).

III - METHODE D'AUTOLYSE A L'ETUVE A 37°.-

Cette méthode, employée par FAVRE et DEVUNS (15), puis par BEZANCON, MATHIEU et PHILIBERT (5), est la plus simple : elle est basée sur le principe suivant : le crachat constitué par de la mucine et de la fibrine coagulée, abandonné à une température de 37 à 50°, subit une digestion des albuminoïdes qui solubilise et rend limpide le crachat glaireux; les bacilles tombent au fond du tube suivant les lois de la pesanteur.

Technique

- 1 - Dans un tube à centrifuger mettre 5 à 10 cm³ du crachat et placer à l'étuve à 37°.
- 2 - Suivant les cas, la fluidification se fait du 4ème au 7ème jour. Décanter le liquide surnageant, puiser à l'aide d'une pipette fine dans le culot au fond du tube, et étaler sur lame. Si le résultat est négatif, on peut pratiquer une autre méthode d'homogénéisation sur le culot du tube à centrifuger.

Critique :

Cette méthode présente l'inconvénient d'être extrême-

ment longue, puisqu'elle exige un délai de 4 à 7 jours. Il faut noter aussi que certains crachats ne se fluidifient jamais; les nombreux éléments cellulaires qui subsistent entravent la recherche et rendent le prélèvement difficile à étaler. En outre, ce procédé ne tient pas compte de la densité de l'expectoration que l'on doit rendre obligatoirement inférieure à celle du bacille pour permettre à celui-ci de se déposer au fond du tube.

Pour notre part, nous n'avons enregistré avec cette technique que de médiocres résultats pouvant donner 25 à 32 % d'erreur sur la moyenne et le plus souvent à peine supérieurs à ceux obtenus par la recherche directe (Voir tableaux comparatifs et calculs des erreurs).

I V - METHODE A LA LIGROINE

Cette technique, mise au point par LAROCHE & VIRMEAUX (31), n'exige pas de centrifugation.

Technique

1 - Mettre dans une capsule de porcelaine :

{ Crachat	10 cm ³
{ Eau distillée	100 cm ³
{ Lessive de soude	X gouttes

On chauffe 10 minutes très doucement sur un bec Bunsen.

2 - Ajouter 0 g. 25 de chlorure de sodium par centimètre cube et agiter jusqu'à dissolution.

3 - Verser le mélange après refroidissement complet dans un tube et ajouter un demi-centimètre cube d'un mélange à parties égales d'éther sulfurique et de ligroïne (Essence de pétrole très légère constituée par un mélange de divers hydrocarbures provenant du fractionnement des benzines brutes de pétrole de densité 0,71 - 0,73). Agiter et laisser reposer une heure. Recueillir la pellicule de ligroïne et mettre une goutte sur lame. Laisser sécher à l'étuve, fixer par flambage à l'alcool, puis agiter la lame dans l'eau pour dissoudre le chlorure de sodium; sécher et colorer.

Critique

Le seul avantage de cette méthode est la rapidité de son exécution. Néanmoins, les résultats obtenus sont excessivement variables et incertains; en effet, le point délicat de l'opération est le prélèvement de la pellicule de ligroïne qui renferme les bacilles tuberculeux : celle-ci est fine et ténue et son peu d'homogénéité la rend très difficile à étaler, très peu adhérente à la lame; aussi le plus souvent n'en prélève-t-on que des parcelles insuffisantes peu riches en bacilles. En outre, la densité du mélange se trouve diminuée par l'addition de l'éther sulfurique et de la ligroïne, les bacilles ont tendance à tomber au fond du tube. Enfin, la dilution au 1/10ème

entraîne une plus grande difficulté à concentrer les bacilles de KOCH. Ceci explique que nous n'ayons obtenu avec cette technique/des résultats dont la dispersion est assez grande par rapport à la moyenne (24 à 45 %). (Voir tableaux comparatifs et calculs des erreurs).

V - METHODE A L'ACETONE

La méthode a l'acétone, due à RONCHESE (38), précisée par BARBARY (2), comme la précédente, évite la centrifugation.

Technique

1 - On emploie le réactif suivant :

(Lessive de soude	5 cm ³
(Alcool à 95%	25 cm ³
(Eau distillée	75 cm ³

Mélanger dans un verre à pied à l'aide d'un agitateur une partie de crachat pour quatre parties de réactif si l'expectoration est fluide, une partie de crachat pour huit parties de réactif si le crachat est épais.

2 - A l'aide d'une pipette, verser doucement à la surface du mélange 2 cm³ d'acétone sans mêler, puis remplir la pipette d'acétone, l'enfoncer au fond du verre et y projeter l'acétone qui remonte à la surface en entraînant les bacilles.

3 - A la limite de séparation crachat-acétone se forme une

pellicule contenant les bacilles, prélever celle-ci, l'étaler sur lame, fixer et colorer.

Critique

La méthode de RONCHESE présente les mêmes avantages de rapidité et de simplicité que la précédente; mais elle en possède les mêmes inconvénients; la pellicule contenant les bacilles est également très fine et peu homogène, son prélèvement est délicat et l'étalement est difficile. L'acétone solubilise la couche lipidique du bacille de KOCH (6,20 % d'après ANDERSON (1)) et la coloration est souvent défectueuse. En outre, dans ce procédé, l'addition d'alcool à 95° et d'acétone diminue la densité du mélange et une grande partie des bacilles se retrouve au fond du tube. Bref, cette technique ne nous a donné que des résultats décevants (24 à 38 % d'erreur sur la moyenne) surtout lorsque l'expectoration ne contient que peu de bacilles tuberculeux (Voir tableaux comparatifs et calculs des erreurs).

VI - METHODE A L'HYPOBROMITE DE SODIUM

Cette méthode, déjà employée par KHOURI (28), a été reprise et précisée par TERCINET (48).

TECHNIQUE DE KHOURI.-

- 1 - Mélanger :
 { hypobromite de sodium 1 cm³
 { Crachat 10 cm³
- 2 - Mettre à l'étuve à 50° pendant 5 heures ou 10 minutes au bain-marie bouillant.

3 - Ajouter 1/10 du volume d'alcool à 50°.

4 - Centrifuger un quart d'heure et recueillir le culot.

Le plus souvent, ce culot de centrifugation est peu important; aussi avons-nous employé la méthode de TERCINET qui prépare l'hypobromite de sodium extemporanément : celle-ci nous a donné de meilleurs résultats.

TECHNIQUE DE TERCINET.-

1 - Le réactif se prépare de la façon suivante : mélanger à parties égales lessive de soude et eau distillée; dans cette solution, verser par petites quantités à la fois, 1/10ème de brome.

2 - A 10 cm³ de crachat, ajouter par petites portions au moyen d'une pipette 10 cm³ de réactif. Laisser en contact une ou deux heures à froid.

3 - Ajouter quelques centimètres cubes d'alcool amylique (1/4 environ du mélange), puis peu à peu de l'alcool à 90° jusqu'à dissolution de l'alcool amylique, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a plus de liquides superposés.

4 - Centrifuger 10 minutes.

5 - Etaler le culot de centrifugation sur lame et fixer en trempant dans l'alcool à 90° contenant 1/10ème d'acide acétique qui dissout le dépôt de soude dû aux manipulations précédentes.

Critique

Pour M. TERCINET, l'hypobromite de sodium ainsi fraîchement préparé serait supérieur aux hypochlorites alcalins. L'addition d'alcool précipite les peptones insolubles, mais cette précipitation est arrêtée par l'addition d'alcool amylique de poids moléculaire élevé qui change la viscosité du milieu, ce qui permet d'obtenir un culot de centrifugation faible. Cependant, cette technique ne tient pas suffisamment compte de la notion de densité; comme nous le savons, celle du bacille de KOCH est de 1,004 - 1,080, aussi conviendrait-il de s'assurer que la densité du mélange est inférieure à 1,000. Les résultats que nous avons obtenus s'ils ne sont pas aussi dispersés que ceux des deux méthodes précédentes (22 à 30,5 % d'erreur), sont encore entachés de beaucoup d'incertitude (Voir tableaux comparatifs et calculs des erreurs).

VII - METHODE DE DESPEIGNES.

DESPEIGNES (10), puis RENAUX (37), ont utilisé une température élevée pour la recherche du bacille tuberculeux.

Technique

Le crachat, placé dans un flacon bouché par un tampon de coton, est stérilisé à l'autoclave pendant 2 à 3 minutes à 120°. On le centrifuge. On décante et on ajoute au culot 10 à 20 volumes de soude N/10. On porte 5 à 10 minutes

au bain-marie bouillant et on centrifuge encore chaud pendant 15 minutes à 2.000 tours. On étale le culot et on colore.

Critique

Les résultats que nous avons obtenus avec cette méthode ont été, en général, médiocres. Le plus souvent, à l'autoclave, le crachat se dessèche complètement; il devient alors granuleux et friable et le culot de centrifugation ne peut être que très difficilement étalé sur lame. Les éléments cellulaires qui subsistent entravent la recherche. De plus, le passage à l'autoclave à très haute température entraîne l'insolubilité des albumines de l'expectoration, ce qui nuit à l'homogénéisation. En résumé, ce procédé ne concentre pas les bacilles tuberculeux, et il déshydrate seulement le crachat; il ne tient pas non plus suffisamment compte de la densité.

VIII - METHODE DE CARLO FRIGIMELICA.-

La méthode de C. FRIGIMELICA (18) combine à la fois la centrifugation et un phénomène d'adsorption des bacilles par un précipité.

Technique

1 - Dans un ballon pyrex, mettre 10 cm³ du crachat à

examiner et 10 cm³ d'eau distillée.

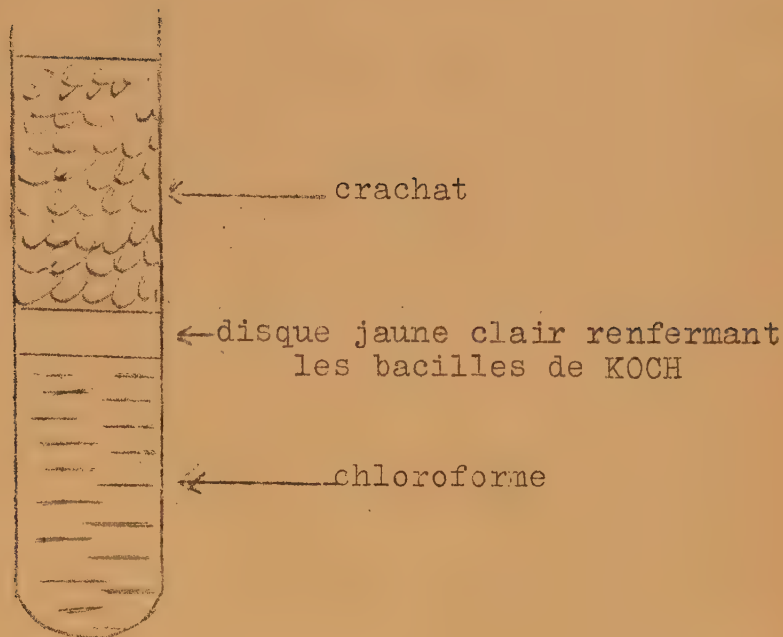
2 - Ajouter 1/10ème du volume du mélange de solution aqueuse saturée d'acide picrique. Agiter vigoureusement et mettre au bain-marie bouillant pendant 30 secondes.

3 - Ajouter autant de gouttes de potasse caustique à 10 % qu'il est nécessaire pour que la masse s'éclaircisse et se fluidifie, soit 2 gouttes par centimètre cube pour les crachats peu épais, 3 à 5 gouttes par centimètre cube pour les crachats visqueux. Mettre au bain-marie bouillant pendant 30 secondes et laisser refroidir.

4 - Dans un tube à centrifuger, mettre 2/3 du mélange et 1/3 de chloroforme. Agiter pendant 2 à 3 minutes.

5 - Centrifuger 5 minutes à raison de 1.000 à 1.200 tours-minute.

6 - Il se forme dans le tube trois zones nettement distinctes : au-dessus, le crachat; au fond, le chloroforme; à la limite de séparation un anneau crémeux, jaune clair de 2 à 3 m/m d'épaisseur, renfermant les bacilles de KOCH.

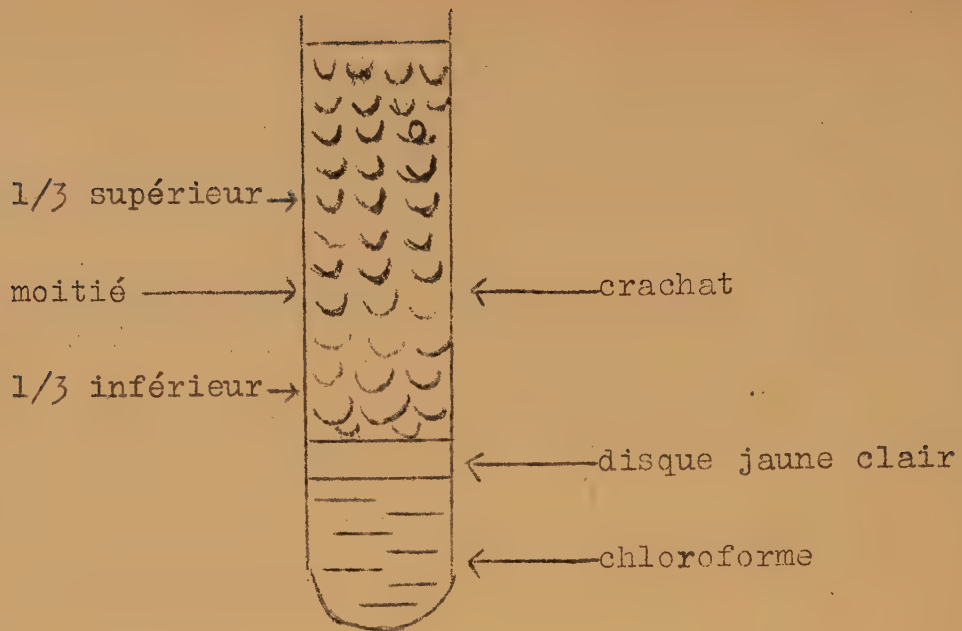


Enlever à l'aide d'une pipette effilée la zone supérieure jusqu'au disque jaune clair. Faire un prélèvement dans ce disque à l'aide d'une anse de platine et étaler sur lame.

Critique

La centrifugation suffit-elle à collecter tous les bacilles tuberculeux dans l'anneau qui sépare le chloroforme du crachat homogénéisé ? Pour nous en rendre compte, nous avons procédé à l'expérience suivante :

A l'aide d'une pipette Pasteur très effilée, nous avons prélevé une goutte de crachat à différents niveaux de la zone supérieure à l'anneau ($\frac{1}{3}$ supérieur, milieu, $\frac{1}{3}$ inférieur).



Nous avons mis cette goutte sur lame, séché, fixé et coloré. Sur 27 prélèvements, nous avons trouvé deux préparations renfermant un seul bacille de KOCH par lame, comme le montre le tableau ci-dessous :

	<u>1/3 supérieur</u>	<u>moitié</u>	<u>1/3 inférieur</u>
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	1
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	1
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0

Ces chiffres relativement peu élevés en bacilles non collectés s'expliquent par le fait que le chloroforme liquide très dense (1,495 à 152) entraîne les bacilles au cours de la centrifugation et les abandonne dans le disque de

séparation. En outre, avec la potasse l'acide picrique donne un précipité de picrate de potassium qui adsorbe les bacilles tuberculeux; cette double action a pour but d'éliminer l'influence de la centrifugation et la différence de densité entre les bacilles et le crachat ne joue pratiquement pas.

Signalons aussi que si la quantité de potasse au 1/10ème, ajoutée est insuffisante, le précipité de picrate de potassium est granuleux, peu homogène et très difficile à étaler. L'addition de potasse est donc un point délicat de l'opération; il faut obtenir un disque de séparation crémeux, compact et adhérent dans lequel le prélèvement est alors facile.

Cette méthode est nettement supérieure aux autres; elle permet de retrouver plus de bacilles et les erreurs sur la moyenne sont entre 18 et 25 %, c'est-à-dire que la dispersion est acceptable pour une méthode biologique.

Pour permettre une vue d'ensemble des résultats que nous avons obtenus, nous présentons dans les pages suivantes 4 tableaux à l'aide desquels on pourra comparer les résultats expérimentaux que nous avons cités jusqu'ici sous forme de moyennes arithmétiques. Il nous a paru intéressant d'examiner la grandeur relative des erreurs que nous pouvions commettre, afin de nous rendre compte de la précision de

chaque méthode et de la valeur des moyennes arithmétiques que nous présentons.

Nous avons établi pour chaque méthode, et ceci dans le cadre de tous les tableaux, la moyenne arithmétique des résultats de 24 observations. Ce nombre élevé d'échantillons nous assure une moyenne qui a plus de chances d'approcher la vraie valeur, quoique la dispersion de ces 24 valeurs soit un peu élevée. L'estimation de l'écart-type de chaque valeur par rapport à la moyenne, mathématiquement simple, pose, en réalité, un problème selon l'échantillonnage. Ces mesures sont distribuées suivant la loi de POISSON (51), puisque nos préparations sont homogènes : la distribution est dissymétrique par rapport à la moyenne. En effet, la dispersion des mesures est une résultante : elle se compose de la dispersion des mesures autour de la moyenne arithmétique, et de la dispersion de cette même moyenne autour de la moyenne exacte, ce qui est représenté par :

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N}} \quad \text{et} \quad \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

$\bar{x}$ = moyenne arithmétique
 N = nombre d'observations
 σ = écart-type exact.

En composant ces variances (ou moyenne des carrés des écarts), on arrive à une estimation exacte de la variance d'une mesure, c'est-à-dire; non à σ^2 , mais à $\sigma^2 - \frac{\sigma^2}{N}$.

Donc, la véritable estimation de σ est :

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

En réalité, notre nombre d'échantillons étant relativement élevé, puisqu'on estime que 5 est la limite entre grands et petits échantillons, nous nous contenterons, pour nos calculs d'évaluer σ comme :

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N}}$$

La variabilité de la moyenne, donnée par l'écart-type, décroît inversement à la racine carrée du nombre N de mesures. L'écart-type de la moyenne est donc :

$$\frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \frac{\text{écart-type d'une observation}}{\sqrt{N}}$$

ou

$$E = \frac{1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{\sum d^2}{N}}$$

Enfin, la formule de BURN (36) nous permet d'exprimer l'erreur maximum pour cent de chaque résultat. Elle est définie par la formule :

$$\frac{300 E}{\bar{x}}$$

et évalue l'exactitude d'une moyenne de mesures expérimentales.

TABLEAU II

UNE GOUTTE DE CRACHAT (à 50-70 BK par champ)

POUR 10 g. DE CRACHAT SANS BK

Nombre de BK pour 50 champs -

Nº	Direct	I Phili- bert & Bezan- çon	II Anti- formine	III Auto- lyse	IV Ligroi- ne	V Acé- tone	VI Hypo- bro- mite	VII Despei- gnes	VIII Frigi- mélica
1	3	8	7	3	4	5	8	2	16
2	5	28	13	6	8	6	12	6	44
3	2	16	10	11	8	6	11	4	38
4	3	15	10	6	8	9	12	2	26
5	4	24	16	13	12	16	26	6	24
6	5	22	11	9	7	9	23	8	36
7	13	29	24	14	15	12	26	4	46
8	3	21	26	7	12	6	20	7	30
9	2	33	20	6	19	16	13	5	31
10	2	10	12	6	5	7	16	4	27
11	10	39	34	22	17	28	31	18	51
12	1	22	20	11	9	11	19	4	23
13	8	54	59	29	29	34	39	10	83
14	2	40	29	12	17	19	28	13	34
15	1	21	24	8	6	9	15	7	33
16	2	38	18	12	11	6	28	4	52
17	1	28	12	8	5	9	12	1	16
18	7	40	38	24	27	12	22	11	79
19	3	32	20	21	18	7	18	10	48
20	8	51	59	20	12	31	51	11	86
21	2	29	12	11	6	19	24	6	30
22	4	49	40	16	21	9	41	5	76
23	2	29	21	13	6	7	20	3	38
24	7	38	35	18	21	17	27	14	59
--	4,16	29,84	23,75	12,75	12,62	12,91	22,66	6,87	42,75

MOYENNES ARITHMETIQUES

TABLEAU III

UNE GOUTTE DE CRACHAT (à 50-70 BK par champ)

POUR 15 g. DE CRACHAT SANS BK

Nombre de BK pour 50 champs

Nº	Direct.	I Phili- bert & Bezan- çon	II Anti- formine	III Auto- lyse	IV Ligroi- ne	V Acé- tone	VI Hypo- bro- mite	VII Des- pei- gnes	VIII Frigi- mélica
1	1	21	9	3	2	7	12	2	33
2	0	18	13	7	4	9	16	2	27
3	0	30	19	3	11	7	18	9	51
4	4	31	21	17	19	9	37	4	38
5	1	29	21	6	3	12	22	4	20
6	8	28	29	16	17	13	23	6	36
7	0	40	22	7	7	9	13	1	31
8	1	18	20	9	4	11	4	6	37
9	0	21	12	13	2	7	16	0	39
10	6	29	24	16	17	11	26	7	40
11	2	39	21	19	7	18	30	9	68
12	3	40	31	9	21	12	29	5	48
13	1	34	12	14	11	7	12	3	29
14	0	20	17	6	7	14	18	1	41
15	4	32	13	14	19	13	31	6	51
16	1	28	16	11	7	9	27	9	36
17	3	37	23	7	12	12	21	3	51
18	1	34	29	13	17	14	31	4	48
19	0	27	14	5	8	4	12	0	26
20	2	22	16	7	13	9	24	3	41
21	0	27	2	2	6	16	12	1	14
22	1	22	17	7	4	3	17	4	30
23	0	17	12	5	2	7	12	1	24
24	0	19	12	4	7	2	11	2	34
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1,69	27,62	17,7	9,16	9,45	9,79	19,75	3,83	37,2

MOYENNES ARITHMETIQUES

TABLEAU IV

UNE GOUTTE DE CRACHAT (à 50-70 BK par champ)

- POUR 20 g. de CRACHAT SANS BK

Nombre de BK pour 50 champs

Nº	Direct	I Phili- bert & Bezan- çon	II Anti- formine	III Auto- lyse	IV Li- groïne	V Acé- tone	VI Hypo- bro- mite	VII Despei- gnes	VIII Frigi- mélina
1	0	7	2	2	1	2	4	0	12
2	0	3	1	1	2	4	3	0	8
3	1	12	8	3	2	2	4	2	17
4	3	15	7	5	8	4	7	4	15
5	0	14	6	3	1	5	4	0	24
6	0	7	9	4	5	1	7	1	13
7	0	17	5	2	1	3	6	4	14
8	2	12	13	7	5	4	11	3	19
9	4	14	13	7	8	4	16	13	39
10	0	6	7	2	1	1	5	1	14
11	0	2	3	1	1	0	2	0	8
12	0	17	9	2	9	4	9	4	29
13	1	20	21	3	2	4	11	2	22
14	0	11	6	4	0	5	4	6	17
15	0	7	11	6	2	6	9	0	12
16	1	12	4	5	8	2	13	1	21
17	0	5	4	2	0	3	6	2	11
18	0	9	1	2	4	7	7	2	10
19	2	14	6	5	4	7	12	3	19
20	0	11	4	1	6	1	4	0	14
21	4	13	12	4	7	6	11	2	18
22	0	8	12	4	7	5	12	0	13
23	2	11	9	4	5	3	13	3	12
24	0	13	11	6	3	1	4	1	24
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	0,83	10,83	7,66	3,54	3,83	3,50	7,66	2,25	16,9

MOYENNES ARITHMETIQUES

MOYENNES ARITHMETIQUES DES RESULTATS
ET CALCUL DES ERREURS

I - Erreurs sur la Méthode DIRECTE.-

12 - TABLEAU I

24 observations : moyenne arithmétique

$$\bar{x} = \frac{299}{24} = 12,45$$

Ecart-types par rapport à la moyenne

- 4,45
- 2,45
- 2,45
+ 0,55
- 1,45
- 5,45
+ 4,55
- 2,45
+ 4,55
- 4,45
+ 6,55
- 0,45
+ 8,55
- 5,45
+ 2,55
+ 0,55
+ 11,55
- 2,45
- 6,45
+ 0,55
+ 0,55
- 0,45
- 4,45
+ 2,55

On fait le carré de chaque écart-type et on additionne,
soit $\sum d^2 : 491,9600$

$$E = \frac{\sqrt{491,9600}}{24} = \frac{22,1801}{24} = 0,9241$$

$$\text{moyenne } m = 12,45 \pm 0,92$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,9241}{12,45} = 22,26 \text{ p. } 100$$

2^e - TABLEAU II

$$\bar{x} = \frac{100}{24} = 4,16$$

$$\sum d^2 = 227,3344$$

$$E = \frac{\sqrt{227,3344}}{24} = 0,6282$$

$$m = 4,16 \pm 0,63$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,6282}{4,16} = 45,30 \text{ p. } 100$$

3^e - TABLEAU III

$$\bar{x} = \frac{41}{24} = 1,69$$

$$\sum d^2 = 98,9664$$

$$E = \frac{\sqrt{98,9664}}{24} = 0,4145$$

$$m = 1,69 \pm 0,41$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,4145}{1,69} = 73,57 \text{ p. } 100$$

4^e - TABLEAU IV

$$\bar{x} = \frac{20}{24} = 0,83$$

$$\sum d^2 = 39,3336$$

$$E = \frac{\sqrt{39,3336}}{24} = 0,2613$$

$$m = 0,83 \pm 0,26$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,2613}{0,83} = 94,44 \%$$

II - Erreurs sur la méthode de MM. PHILIBERT ET BEZANCON. -

1^e - TABLEAU I

$$\bar{x} = \frac{1548}{24} = 64,50$$

$$\sum d^2 = 97,26$$

$$E = \frac{\sqrt{97,26}}{24} = 4,1091$$

$$m = 64,50 \pm 4,11$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 4,1091}{64,50} = 19,11 \%$$

2^e - TABLEAU II

$$\bar{x} = \frac{716}{24} = 29,84$$

$$\sum d^2 = 3441,3344$$

$$E = \frac{\sqrt{3441,3344}}{24} = 2,4442$$

$$m = 29,84 \pm 2,44$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 2,4442}{29,84} = 24,57 \%$$

3^e - TABLEAU III

$$\bar{x} = \frac{663}{24} = 27,62$$

$$\sum d^2 = 1227,6256$$

$$E = \frac{\sqrt{1227,6256}}{24} = 1,4598$$

$$m = 27,62 \pm 1,46$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 1,4598}{27,62} = 15,85 \%$$

4^e - TABLEAU IV

$$\bar{x} = \frac{260}{24} = 10,83$$

$$\sum d^2 = 473,3336$$

$$E = \frac{\sqrt{473,3336}}{24} = 0,9065$$

$$m = 10,83 \pm 0,91$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,9065}{10,83} = 25,11 \%$$

III - Erreurs sur la méthode à l'ANTIFORMINE.1^e - TABLEAU I

$$\bar{x} = \frac{1270}{24} = 52,91$$

$$\sum d^2 = 7417,7344$$

$$E = \frac{\sqrt{7417,7344}}{24} = 3,5885$$

$$m = 52,91 \pm 3,59$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 3,5885}{52,91} = 20,34 \%$$

2^e - TABLEAU II

$$\bar{x} = \frac{570}{24} = 23,75$$

$$\sum d^2 = 4710,5000$$

$$E = \frac{\sqrt{4710,5000}}{24} = 2,8597$$

$$m = 23,75 \pm 2,86$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 2,8597}{23,75} = 36,12 \%$$

3^e - TABLEAU III

$$\bar{x} = \frac{425}{24} = 17,70$$

$$\sum d^2 = 1073,96$$

$$E = \frac{\sqrt{1073,96}}{24} = 1,3654$$

$$m = 1,3654 \pm 1,36$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 1,3654}{17,70} = 23,14 \%$$

4^e - TABLEAU IV

$$\bar{x} = \frac{184}{24} = 7,66$$

$$\sum d^2 = 499,3344$$

$$E = \frac{\sqrt{499,3344}}{24} = 0,9310$$

$$m = 7,66 \pm 0,93$$

$$\text{Erreur maxima} : \frac{300 \times 0,9310}{7,66} = 36,46 \%$$

IV - Erreurs sur la méthode d'AUTOLYSE.

1^e - TABLEAU I

$$\bar{x} = \frac{711}{24} = 29,62$$

$$\sum d^2 = 3611,6256$$

$$E = \frac{\sqrt{3611,6256}}{24} = 2,5109$$

$$m = 29,62 \pm 2,51$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 2,5109}{29,62} = 25,43 \%$$

2^e - TABLEAU II

$$\bar{x} = \frac{306}{24} = 12,75$$

$$\sum d^2 = 1016,5000$$

$$E = \frac{\sqrt{1016,5000}}{24} = 1,3284$$

$$m = 12,75 \pm 1,33$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 1,3284}{12,75} = 31,25 \%$$

3^e - TABLEAU III

$$\bar{x} = \frac{224}{24} = 9,16$$

$$\sum d^2 = 593,2944$$

$$E = \frac{\sqrt{593,2944}}{24} = 0,9887$$

$$m = 9,16 \pm 0,99$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,9887}{9,16} = 32,38 \%$$

4^e - TABLEAU IV

$$\bar{x} = \frac{85}{24} = 3,54$$

$$\sum d^2 = 77,9584$$

$$E = \frac{\sqrt{77,9584}}{24} = 0,3678$$

$$m = 3,54 \pm 0,37$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,3678}{3,54} = 31,16 \%$$

V - Erreurs sur la méthode de la LIGROINE

1^{re} - TABLEAU I

$$\bar{x} = \frac{869}{24} = 36,20$$

$$\sum d^2 = 5027,96$$

$$E = \frac{\sqrt{5027,96}}{24} = 2,9545$$

$$m = 36,20 \pm 2,95$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 2,9545}{36,20} = 24,48 \%$$

2^{re} - TABLEAU II

$$\bar{x} = \frac{303}{24} = 12,62$$

$$\sum d^2 = 1163,6256$$

$$E = \frac{\sqrt{1163,6256}}{24} = 1,4216$$

$$m = 12,62 \pm 1,42$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 1,4216}{12,62} = 33,79 \%$$

3^{re} - TABLEAU III

$$\bar{x} = \frac{227}{24} = 9,45$$

$$\sum d^2 = 851,9600$$

$$E = \frac{\sqrt{851,96}}{24} = 1,2161$$

$$m = 9,45 \pm 1,22$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 1,2161}{9,45} = 38,60 \%$$

4^{re} - TABLEAU IV

$$\bar{x} = \frac{92}{24} = 3,83$$

$$\sum d^2 = 191,3336$$

$$E = \frac{\sqrt{191,3336}}{24} = 0,5763$$

$$m = 3,83 \pm 0,58$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,5763}{3,83} = 45,14 \%$$

VI - Erreurs sur la méthode à l'ACETONE.-

1^e - TABLEAU I

$$\bar{x} = \frac{893}{24} = 37,20$$

$$\sum d^2 = 7271,96$$

$$E = \frac{\sqrt{7271,96}}{24} = 3,5531$$

$$m = 37,20 \pm 3,55$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 3,5531}{37,20} = 28,65 \%$$

2^e - TABLEAU II

$$\bar{x} = \frac{310}{24} = 12,91$$

$$\sum d^2 = 1550,7344$$

$$E = \frac{\sqrt{1550,7344}}{24} = 1,6408$$

$$m = 12,91 \pm 1,64$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 1,6408}{12,91} = 38,12 \%$$

3^e - TABLEAU III

$$\bar{x} = \frac{235}{24} = 9,79$$

$$\sum d^2 = 361,9584$$

$$E = \frac{\sqrt{361,9584}}{24} = 0,7927$$

$$m = 9,79 \pm 0,79$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,7927}{9,79} = 24,29 \%$$

4^e - TABLEAU IV

$$\bar{x} = \frac{84}{24} = 3,50$$

$$\sum d^2 = 90,25$$

$$E = \frac{\sqrt{90,25}}{24} = 0,3958$$

$$m = 3,5 \pm 0,39$$

$$\text{Erreur maxima} = \frac{300 \times 0,3958}{3,5} = 33,92 \%$$

VII - Erreurs sur la méthode à l'HYPOBROMITE

1^e - TABLEAU I

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{1112}{24} = 46,33 \\ \sum d^2 &= 6829,3336 \\ E &= \frac{\sqrt{6829,3336}}{24} = 3,4433 \\ m &= 46,33 \pm 3,44 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 3,4433}{46,33} = 22,29 \%\end{aligned}$$

2^e - TABLEAU II

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{544}{24} = 22,66 \\ \sum d^2 &= 2513,9744 \\ E &= \frac{\sqrt{2513,9744}}{24} = 2,0891 \\ m &= 22,66 \pm 2,09 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 2,0891}{22,66} = 27,65 \%\end{aligned}$$

3^e - TABLEAU III

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{474}{24} = 19,75 \\ \sum d^2 &= 1580,5000 \\ E &= \frac{\sqrt{1580,5000}}{24} = 1,5425 \\ m &= 19,75 \pm 1,54 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 1,5425}{19,75} = 23,43 \%\end{aligned}$$

4^e - TABLEAU IV

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{184}{24} = 7,66 \\ \sum d^2 &= 349,3344 \\ E &= \frac{\sqrt{349,3344}}{24} = 0,7787 \\ m &= 7,66 \pm 0,78 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 0,7787}{7,66} = 30,49 \%\end{aligned}$$

VIII - Erreurs sur la méthode de DESPEIGNES

1^e - TABLEAU I

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{434}{24} = 18,08 \\ \sum d^2 &= 1369,8336 \\ E &= \frac{\sqrt{1369,8336}}{24} = 1,5421 \\ m &= 18,08 \pm 1,54 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 1,5421}{18,08} = 25,58 \%\end{aligned}$$

2^e - TABLEAU II

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{165}{24} = 6,87 \\ \sum d^2 &= 414,6256 \\ E &= \frac{\sqrt{414,6256}}{24} = 0,8484 \\ m &= 6,87 \pm 0,85 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 0,8484}{6,87} = 37,04 \%\end{aligned}$$

3^e - TABLEAU III

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{92}{24} = 3,83 \\ \sum d^2 &= 179,3336 \\ E &= \frac{\sqrt{179,3336}}{24} = 0,5579 \\ m &= 3,83 \pm 0,56 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 0,5579}{3,83} = 43,69 \%\end{aligned}$$

4^e - TABLEAU IV

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{54}{24} = 2,25 \\ \sum d^2 &= 182,5000 \\ E &= \frac{\sqrt{182,5000}}{24} = 0,5628 \\ m &= 2,25 \pm 0,56 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 0,5628}{2,25} = 75,04 \%\end{aligned}$$

IX - Erreurs sur la méthode de FRIGIMELICA.-1^e - TABLEAU I

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{1793}{24} = 74,70 \\ \sum d^2 &= 13911,16 \\ E &= \frac{\sqrt{13911,16}}{24} = 0,4914 \\ m &= 74,70 \pm 0,49 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 0,4914}{74,70} = 19,73 \%\end{aligned}$$

2^e - TABLEAU II

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{1026}{24} = 42,75 \\ \sum d^2 &= 3957, \\ E &= \frac{\sqrt{3957,}}{24} = 2,6210 \\ m &= 37,20 \pm 2,36 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 2,6210}{42,75} = 18,39 \%\end{aligned}$$

3^e - TABLEAU III

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{893}{24} = 37,20 \\ \sum d^2 &= 3219,96 \\ E &= \frac{\sqrt{3219,96}}{24} = 2,3643 \\ m &= 37,20 \pm 2,36 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 2,3643}{37,20} = 19,06 \%\end{aligned}$$

4^e - TABLEAU IV

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{405}{24} = 16,87 \\ \sum d^2 &= 1160,6256 \\ E &= \frac{\sqrt{1160,6256}}{24} = 1,4194 \\ m &= 16,87 \pm 1,42 \\ \text{Erreur maxima} &= \frac{300 \times 1,4191}{16,87} = 25,24 \%\end{aligned}$$

C H A P I T R E V I

ESSAI d'AMELIORATION de la METHODE de C. FRIGIMELICA

Pour la comparaison des méthodes d'homogénéisation que nous venons d'étudier, nous avons dressé les quatre tableaux comparatifs précédents de la façon suivante : nous avons examiné 50 champs par lame à raison de 24 lames par méthode de concentration. Pour chaque examen, nous avons mélangé une goutte (prélevée avec une pipette Pasteur) de crachat contenant 50 à 70 bacilles tuberculeux par champ, avec 5, 10, 15 ou 20 g. de crachat sans bacille.

De l'examen de nos résultats et des moyennes arithmétiques de ceux-ci, il ressort que nous pouvons classer les méthodes d'homogénéisation dans l'ordre suivant :

METHODES	Moyennes de bacilles trouvés	Erreurs sur la moyenne
1) de Frigimélica	16,90 à 74,70	18 à 25 %
2) de Philibert et Bezangon	10,80 à 64,50	16 à 25 %
3) à l'antiformine ...	7,60 à 52,90	20 à 36,50 %
4) à l'hypobromite de sodium	7,60 à 46,30	22 à 30,50 %
5) à la ligroïne	3,80 à 36,20	24 à 45 %
6) à l'acétone	3,50 à 37,20	24 à 38 %
7) d'autolyse à l'étuve à 37°	3,50 à 29,60	25 à 32 %
8) de Despeignes	2,20 à 18,10	25 à 75 %

Ainsi, la méthode de C. FRIGIMELICA permet de retrouver plus de bacilles pour un même crachat et la dispersion des résultats est la plus faible; c'est pourquoi, dans le but de perfectionner encore la recherche du bacille tuberculeux, nous nous sommes fondé sur cette technique.

Comme les autres méthodes, elle exige un certain nombre de manipulations que nous avons cherché à réduire, de façon à la rendre plus rapide à exécuter et à éviter ainsi les erreurs et la possibilité d'introduction de bacilles acido-résistants autres que le bacille de KOCH; nous pratiquons donc toutes les additions de réactifs directement dans le tube à centrifuger ce qui a, en même temps, l'avantage de diminuer considérablement les risques de contamination. Nous choisissons un tube de faible diamètre pour que l'anneau qui contient les bacilles soit de la plus grande épaisseur possible.

La durée de l'opération est ainsi notablement réduite; alors que la méthode originale demande une heure pour être exécutée, la méthode ainsi modifiée n'exige que 30 minutes (nous ne comprenons pas dans ces temps la coloration des lames).

Diminuer la durée d'exécution de la technique de FRIMIGELICA ne suffisait pas, il nous fallait tenter d'augmenter la sûreté de ces résultats. Il nous a paru que nous devrions nous efforcer de trouver un produit qui, par ses

propriétés physico-chimiques, répond mieux que le chloroforme aux diverses nécessités de cette recherche.

Or, ces nécessités, il importe de les bien connaître et pour cela de les bien définir.

Nous nous sommes donc préoccupé de savoir : d'une part si les résultats dépendent de la densité du liquide ajouté, d'autre part, s'ils sont fonction de la densité du crachat.

Notre procédé est basé sur la connaissance de la densité du bacille tuberculeux, densité qui varie de 1,004 à 1,080, pour séparer les bacilles par gravité, à l'aide de manipulations simples et rapides, de l'exsudat qui les renferme, et pour les recueillir ensuite dans un liquide très différencié, très apparent et de faible volume.

Ces manipulations comportent l'emploi d'un liquide qui doit répondre aux exigences ci-après indiquées :

- a) - Il doit avoir une densité nettement supérieure à 1,080 pour constituer le culot de centrifugation.
- b) - Il doit être le moins possible miscible à l'eau pour éviter une émulsion avec le crachat lors du mélange par agitation.
- c) - Il ne doit pas être susceptible de neutraliser l'alcalinité des crachats pour éviter une précipitation des albumines.
- d) - Il doit être incolore pour permettre une facile observation.

e) - Il doit être ininflammable, car l'homogénéisation exige une élévation de température.

Notre choix s'est porté sur quatre solvants industriels très denses (R. FABRE (16)) :

1^{re} - Le Trichloréthylène, ou triéline, C_2HCl_3 , liquide incolore, incombustible, insoluble dans l'eau, stable en présence des alcalis dilués, de densité à 15°C : 1,460.

2^{de} - Le perchloréthylène, C_2Cl_4 , liquide incolore, ininflammable, insoluble dans l'eau, à odeur aromatique, de densité à 15°C : 1,628.

3^{de} - Le tétrachlorure de carbone CCl_4 , liquide incolore, incombustible, insoluble dans l'eau, de densité à 15°C : 1,629.

4^{de} - Le bromoforme, CHBr_3 , liquide incolore, très peu soluble dans l'eau, de densité à 15°C : 2,89.

Nous avons donc repris nos expériences avec chacun de ces différents liquides, et nous avons condensé les résultats obtenus dans le tableau ci-dessous.

L'étude de ce tableau et, en particulier, des moyennes arithmétiques obtenues à l'aide de ces résultats, nous démontre que l'augmentation de densité du liquide ajouté n'assure pas une meilleure concentration des bacilles; les résultats ne sont ni supérieurs, ni plus constants qu'avec

le chloroforme de la méthode originale, même avec le bromo-
forme qui possède cependant une densité beaucoup plus élevée
que les autres.

UNE GOUTTE DE CRACHAT (à 50 - 70 BK par champ)

POUR 20 g. DE CRACHAT SANS BK

Nombre de bacilles de Koch pour 50 champs

	Trichlor - éthylène d = 1,460	Chloro- forme d = 1,495	Perchlor - éthylène d = 1,628	Tétra- chlorure d = 1,629	Bromo- Forme d = 2,89
1	10	7	9	11	8
2	6	12	10	6	6
3	13	10	8	9	11
4	5	7	6	8	8
5	7	7	9	6	6
6	11	6	5	10	7
7	6	4	4	7	3
8	9	7	8	5	9
9	4	7	9	12	7
10	5	10	7	15	12
11	6	9	17	9	7
12	14	16	8	12	7
Moyennes arith- métiques	8	8,50	8,33	9,16	7,58

Au contraire avec le bromoforme, la moyenne arithmétique est inférieure à celle des autres liquides employés.

De ceci, nous avons dégagé l'observation suivante :
La condition nécessaire et suffisante pour que la recherche du bacille tuberculeux soit faite dans de bonnes conditions exige seulement que la densité du liquide ajouté soit supérieure à celle du bacille, c'est-à-dire à 1,080.

Mais le second facteur du problème est la densité du crachat; nous devons nous assurer que la densité du liquide homogénéisé est inférieure à 1,004, c'est-à-dire à la densité du bacille tuberculeux.

A l'aide d'un petit densimètre, nous avons donc recherché la densité moyenne des crachats après homogénéisation et nous avons trouvé le chiffre moyen de 1,024.

Pour ramener ce chiffre à un taux inférieur, nous avons eu recours à l'éther sulfurique dont la densité à 20° est de 0,720. Dans la technique, nous avons donc remplacé l'eau distillée simple par une eau distillée saturée d'éther sulfurique (soluble à 10 % dans l'eau) dont la densité est de 0,972. En effet, si nous nous reportons à la technique exposée plus loin, nous constatons qu'en mélangeant 2 parties de crachat (densité : 1,024) et 6 parties d'eau distillée saturée d'éther sulfurique (densité : 0,972) nous obtenons pour le crachat homogénéisé une densité de 0,990, inférieure à celle du bacille tuberculeux.

Mais les liquides (chloroforme, trichloréthylène, perchloréthylène, bromoforme, tétrachlorure de carbone) que nous avons précédemment expérimentés, étaient miscibles avec le liquide homogénéisé éthéré. Force nous était donc de tourner cette nouvelle difficulté en recherchant un produit chimique, dans la catégorie des produits dont nous avons indiqué les caractéristiques, produit non miscible à l'éther sulfurique et à l'eau.

Ce produit est l' α -monochloronaphtalène $C_{10}H_7Cl$, de densité à 15° : 1,22, liquide incolore, à légère odeur de naphtaline, bouillant à 263° , insoluble dans l'eau, non miscible à l'éther sulfurique, employé pour la fabrication des colorants et des antimites.



{ crachat (D = 1,024) }
 { + } D = 0,990
 { eau distillée saturée }
 { d'éther (D = 0,972) }

Bacilles de KOCH (D = 1,004 - 1,080)

α -monochloronaphtalène
(insoluble eau et éther) D = 1,22

Après centrifugation, nous avons donc trois zones de densités différentes :

- 1^o - A la partie supérieure du tube à centrifuger, le mélange crachat et eau distillée saturée d'éther sulfurique de densité : 0,990.
- 2^o - A la partie inférieure, l' α -monochloronaphtalène, insoluble dans l'eau et dans l'éther sulfurique, de densité 1,22.
- 3^o - A la limite de séparation, l'anneau contenant les bacilles tuberculeux de densité 1,004 - 1,080.

La technique se réduit donc à utiliser les différences de densités entre deux liquides et le bacille de KOCH.

Nous avons opéré simultanément par la méthode primitive au chloroforme et par la méthode à l' α -monochloronaphtalène; les résultats, appuyant nos hypothèses, se sont révélés meilleurs avec cette dernière.

UNE GOUTTE DE CRACHAT (à 50 - 70 BK par champ)

POUR 20 g. de CRACHAT SANS BK

Nombre de bacilles de KOCH pour 50 champs

	chloroforme	α-monochloro- naphtalène
1	7	13
2	11	17
3	8	10
4	5	14
5	8	14
6	8	13
7	10	10
8	7	12
9	3	8
10	7	7
11	12	9
12	7	14
13	13	9
14	5	12
15	12	18
16	7	4
17	9	10
18	8	8

Moyennes arithmétiques ..

8,16

11,22

Nous constatons que la moyenne des résultats passe, avec l' α -monochloronaphtalène, de 8,16 à 11,22, ce qui dénote une amélioration d'environ 30 %.

Le calcul des erreurs nous donne les résultats ci-dessous :

Erreur sur la méthode au CHLOROFORME.-

$$\bar{x} = 8,16$$

$$\sum d^2 = 118,5008$$

$$E = \frac{\sqrt{118,5008}}{18} = 0,6055$$

$$m = 8,16 \pm 0,60$$

$$\text{Erreur maximum} = \frac{300 \times 0,6055}{8,16} = 22,26 \%$$

Erreur sur la méthode à l' α -MONOCHLORONAPHTALÈNE.-

$$\bar{x} = 11,22$$

$$\sum d^2 = 215,1112$$

$$E = \frac{\sqrt{215,1112}}{18} = 0,8148$$

$$m = 11,22 \pm 0,81$$

$$\text{Erreur maximum} = \frac{300 \times 0,8148}{11,22} = 21,78 \%$$

Nous constatons ainsi que le pourcentage d'erreur maximum est sensiblement le même dans un cas comme dans l'autre; ceci provient du fait que les gestes opératoires sont semblables et que la dispersion provient du facteur biologique.

Bref, le principe de la méthode se résume comme suit :

Dans un tube à centrifuger, ajouter, à la prise d'essai de crachat, la solution aqueuse saturée d'acide picrique, puis de la potasse caustique pour fluidifier le crachat à l'aide d'une légère élévation de température.

Ensuite, mettre de l'eau distillée saturée d'éther sulfurique pour diminuer la densité du crachat.

Enfin, toujours dans le tube à centrifuger, ajouter l'~~α~~-monochloronaphtalène pour former le culot. Agiter soigneusement et centrifuger. Les bacilles tuberculeux se concentrent à la limite de séparation du crachat et du liquide inférieur, les différents éléments du mélange se plaçant ainsi par ordre de densités dans le tube. On fait un prélèvement dans l'anneau de séparation, on étale, fixe, sèche et colore.

C O N C L U S I O N

L'étude de la composition du crachat et de la constitution chimique du bacille tuberculeux que nous avons faite au début de ce travail, nous a permis de nous rendre compte des difficultés de la détection de ce bacille. Comme nous l'avons exposé plus haut, on n'est jamais entièrement sûr, au cours de la recherche du bacille de KOCH, dans les crachats et, en particulier, lorsqu'on a affaire à des expectorations peu bacillifères, de rencontrer le bacille à l'examen microscopique.

C'est pourquoi de très nombreuses méthodes ont été proposées, soit pour concentrer au maximum les bacilles présents dans l'expectoration sous un faible volume que l'on peut examiner plus aisément, soit pour rendre plus sensible la détection du bacille en le teintant électivement par des substances colorées ou fluorescentes.

Les premières méthodes, dites d'homogénéisation, sont de valeurs inégales; en utilisant comme matériel de comparaison des crachats bacillifères dilués exactement avec des crachats

non bacillifères dans des conditions que nous avons précisées nous avons passé en revue les principales de ces méthodes :

a) - la méthode de PHILIBERT et BEZANCON, qui fluidifie l'expectoration par la lessive de soude et abaisse la densité du milieu renfermant les bacilles, à l'aide d'alcool à 50°.

b) - La méthode à l'antiformine, analogue à la précédente, mais qui remplace la lessive de soude par un mélange d'hypochlorite de chaux et de lessive de soude.

c) - La méthode d'autolyse, qui fluidifie le crachat par un séjour à l'étuve à 37°.

d) - La méthode à la ligroïne, qui englobe les bacilles dans une pellicule d'un mélange éther sulfurique-ligroïne qui remonte à la surface du liquide homogénéisé.

e) - La méthode à l'acétone, voisine de celle à la ligroïne, qui sépare les bacilles grâce à la faible densité de l'acétone remontant à la surface.

f) - La méthode à l'hypobromite de sodium, qui emploie un réactif de fluidification à l'état naissant.

g) - La méthode de DESPEIGNES, qui déshydrate le crachat à l'autoclave à 120°.

h) - La méthode de G. FRIGIMELICA, qui concentre les bacilles à la fois par adsorption et par centrifugation.

Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus avec ces différentes techniques et dont nous avons fait d'ailleurs la critique mathématique pour nous rendre compte des erreurs que nous pouvions commettre, nous ont démontré la supériorité constante de la méthode de C. FRIGIMELICA.

Cependant, la technique originale de cet auteur, comportant à notre avis trop de manipulations et l'emploi d'un matériel trop multiple, il nous a paru qu'il était possible, d'une part de la simplifier, d'autre part en examinant les raisons de sa grande sensibilité, de la rendre encore plus fidèle.

En effet, cette technique s'appuie sur deux bases essentielles :

- a) - La densité du bacille tuberculeux,
- b) - Celle du milieu liquide qui le renferme.

Il est évident que les bacilles se dégageront plus facilement de ce milieu et se concentreront d'une façon plus complète, si la densité de ce milieu est nettement différente de la leur.

Nous avons ainsi les données fondamentales du problème : donner au liquide homogénéisé une densité nettement inférieure à celle du bacille tuberculeux, c'est-à-dire à 1,004 et recueillir le précipité de sédimentation (picrate d'albumine et de potassium) sur un liquide de densité supérieure à celle du bacille, soit 1,080, et non miscible au liquide homogénéisé.

La mise en oeuvre de plusieurs liquides répondant à ces

conditions (en dehors du chloroforme de la méthode originale) nous a démontré que la qualité des résultats obtenus n'augmentait pas en fonction de la densité du liquide ajouté; la condition suffisante était donc que ce liquide possédât une densité nettement supérieure à celle du bacille et, à la réflexion, ceci apparaît comme une conséquence logique de l'idée que nous avons exposée ci-dessus.

D'autre part, pour diminuer la densité du crachats, nous avons utilisé l'artifice qui consiste à diluer la prise d'essai dans un volume suffisant d'eau distillée saturée d'éther sulfurique, ce qui nous donne une densité sensiblement inférieure à celle de l'eau. Comme les liquides que nous avons utilisés précédemment sont miscibles à l'éther, nous avons dû combiner l'utilisation de cette dernière technique avec l'emploi d'un liquide non miscible à l'eau et à l'éther sulfurique, l' α -monochloronaphtalène, dont la densité est supérieure à celle du bacille de KOCH. Les résultats que nous avons obtenus ont été nettement supérieurs à ceux de la technique originale de C. FRIGIMELICA.

La méthode que nous proposons, et qui a l'avantage de s'effectuer uniquement dans un tube à centrifuger, se résume ainsi dans la technique suivante :

- T E C H N I Q U E -

1^o - Dans un tube à centrifuger, verser :

{	crachat	2 cm ³
	solution aqueuse saturée	
	d'acide picrique	VI gouttes

Boucher le tube et agiter 2 à 3 minutes. Mettre au bain-marie bouillant pendant 30 secondes. Laisser refroidir.

2^e - Ajouter de la potasse caustique au 1/10^eme : de IV à X gouttes suivant la viscosité du crachat. Agiter. Mettre au bain-marie bouillant pendant 30 secondes. Laisser refroidir.

3^e - Ajouter 6 cm³ d'eau distillée saturée d'éther sulfurique. Agiter 2 à 3 minutes.

4^e - Verser 2 cm³ d' α -monochloronaphtalène. Agiter vigoureusement pendant 2 à 3 minutes.

5^e - Centrifuger 20 minutes à 2.000 tours - minute.

6^e - A l'aide d'une pipette Pasteur, enlever la partie supérieure du liquide jusqu'au disque de séparation.

7^e - Avec une autre pipette effilée, prélever I ou II gouttes dans l'anneau de séparation qui renferme les bacilles tuberculeux. Etaler, sécher, fixer et colorer par la méthode de SPENGLER.

A l'aide de cette technique, il nous a été possible de retrouver environ 30 p. 100 de plus de bacilles tuberculeux qu'avec la méthode originale de C. FRIGIMELICA; en perfectionnant cette dernière, nous pensons avoir apporté notre contribution à la recherche du bacille de KOCH dans les crachats.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ANDERSON (R.J.) - A Study of the Phosphatide fraction of Tubercle Bacilli. Journ. Biol. Chem. 1927, LXXIV - 537/551.
- 2 - BARBARY - Sur la méthode de Ronchèse dans l'analyse bactériologique des crachats. Bull. Acad. Med. 1925 - t. 97 - p. 340/343.
- 3 - BEKKER (J.H.) - Etude de l'examen microscopique en lumière fluorescente des bacilles tuberculeux dans les crachats. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde an. 1941 - t. 85 - N° 33 - p. 3399.
- 4 - BEZANCON (F.) - PHILIBERT (A.) et GASTINEL (P.) - Importance clinique de l'homogénéisation des crachats. Bull. Soc. Méd. des Hôpitaux 1912 - t. 33 - p. 1467.
- 5 - BEZANCON (F.) MATHIEU (G.) et PHILIBERT (A.) - Augmentation apparente du nombre des bacilles dans les crachats en voie de putréfaction. C.R. Soc. Biol. 1922 - t. 86 - p. 680 - et : Autolyse des crachats tuberculeux à la température de 50 degrés. C.R. Soc. Biol. 1922 - t. 87 - p. 62.
- 6 - CALMETTE (A.) - L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux. Masson et c^e; édit. Paris 1922 - p. 15.
- 7 - CORDONNIER - Note sur une méthode d'enrichissement par histolyse des crachats pour la recherche des bacilles tuberculeux. Bull. Sc. Pharm. 1917 - t. 14 p. 7.
- 8 - CRUVEILHIER (L.) - FAGUET (M.) et Melle GRANDJEAN - Recherche du bacille de Koch au moyen de la méthode du moussage-essorage dans les expectorations et liquide céphalo-rachidien. Bull. Acad. Méd. 1945, n° 5 à 8, p. 84/86 et Paris Médical, 1945 - N° 10 - p. 96/97.
- 9 - CRUVEILHIER (L.) - Recherche du bacille de Koch par la méthode des mousses. Ann. Biol. Clin. 3^{ème} année, Nov. 1945 - N° 9.
- 10 - DESPEIGNES - Nouvelle technique pour la préparation des crachats destinés à la recherche du bacille de Koch. C.R. Soc. Biol. t. 84 - p. 182. (1921)

- 11 - DIALLO - Über den Fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbakterien. Klin. Woch. 1939 - t. 18 N° 40 - p. 1315.
- 12 - DILG et NEBEL - Koch Bazillus - Archiv. f. Hyg. 1904, t. 47 - p. 57.
- 13 - DOGNON (A.) et GOUGEROT (L.) - Concentration et recherche du bacille de Koch dans les liquides par la méthode des mousses - Paris médical. 1943 - N° 4 - p. 24/26.
- 14 - ELECTRA PHILIOU - A propos de la fréquence du bacille de Koch dans les urines par une méthode simple et rapide. Presse médicale 1941 - N° 25 - p. 290.
- 15 - FAVRE et DEVUNS - Sur l'homogénéisation des crachats tuberculeux par auto-digestion spontanée. C.R. Soc. Biol. 1921 - t. 85 - p. 858.
- 16 - FAVRE (R.) - Solvants industriels - Etude toxicologique. Hermann et cie édit. 1942 - p. 63/65.
- 17 - FONTES (A.) - L'Ultravirus tuberculeux - Masson édit. 1932 - p. 19.
- xx 18 - FRIGIMELICA (C.) - Un nuovo metodo di arricchimento per la ricerca del bacillo di Koch. Il Policlinico, 1932 - N° 46 - p. 1776.
- 20 - GRAHAM (R.) Fluorescence microscopy of mycobacterium tuberculosis. American Review of Tuberculosis. Déc. 1943 - p. 421.
- 21 - GRISEZ ET BERNARD (L.) - Un procédé d'homogénéisation des produits tuberculeux par la bile. C.R. Soc. Biol. 1920 - t. 83 - N° 35 - p. 1506.
- 22 - HARISPE (J.V.) - Constitution chimique du bacille de Koch - Pharmacie française - Janv. 1948 - 52ème an. N° 1 p. 1.
- 23 - HAUDUROY (P.) et POSTERNACK (J.) - La recherche du bacille tuberculeux dans les produits pathologiques par la microscopie en fluorescence. Presse méd. du 3 sept. 1941, p. 940/942.

- 24 - HAUDUROY (P.) et POSTERNACK (J.) - Recherche des bacilles tuberculeux dans les expectorations par la microscopie en fluorescence. C.R. Soc. Biol. 1941 N° 9/10, p. 755.
- 25 - HERMANN (M.) - Der Nachweis von Tuberkelbazillen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Deutsch. Med. Woch. du 16 Sept. 1938, p. 1354.
- 26 - JOUSSET (A.) - Nouvelle méthode pour isoler le bacille de Koch des humeurs de l'organisme. Sem. méd. 1903 N° 3, p. 22.
- 27 - KELLER (F.) - Vereinfachter Nachweis von Tuberkelbazillen im Fluoreszenzlicht. Munch. Med. Woch. 1938 t. 85 - N° 52 - p. 2024/2023 - et : Presse méd. 1939 - N° 35 - p. 85.
- 28 - KHOURI - Enrichissement des crachats tuberculeux au moyen de l'hypobromite de sodium. Journ. Pharm. et Chimie - 1921 - N° 1 et 2 - p. 43.
- 29 - KONRICH - Eine neue Färbung für Tuberkelbazillen. Deutsch. Med. Woch. 1920 - t. 55 - p. 741.
- 30 - KRONBERGER - Eine neue einfache Strukturfärbung für die echten sauerfesten, speziell für die Tuberkulosesekreter. Beiträge z. Klin.d.Tüber. 1910, t. 15 - p. 157.
- XX
- 32 - MAILLARD (Melle M.) - Recherche du bacille de Koch dans les crachats. Méthodes de coloration et de concentration. Thèse doct. Pharm. Univ. Nancy 1925.
- 33 - MULIER (H.) - Über Tuberkelbazillen und Sporenfärbung unter Anwendung von Kalziumpercarbonate und Wasserstoffsuperoxyde. Centralbl.f.Bakt. 1901 - t. 291 p. 791.
- 34 - PHILIBERT (A.) - BEZANCON (F.) et GRIFFON (V.) - Recherche du bacille tuberculeux dans le sang par homogénéisation du caillot. C.R. Soc. Biol. 1903, t. 55 - p. 35.
- 35 - PORGES - Über eine neue Färbungsmethode der Tuberkelbazillen im Sputum. Munch. Med. Woch. 1916 - t. 63 - p. 1164.
- 36 - QUEVAUVILLER (A.) - Comment exprime-t-on la toxicité d'une drogue pour l'animal de laboratoire. Pharmacie française 1948 - 52ème an. N° 4 - p. 4.
- XX
- 31 - LAROCHE (G.) et VIRIEUX - Recherche du bacille de Koch par homogénéisation des crachats sans centrifugation. C.R. Soc. Biol. 1918 t. 81 p. 1085

- 37 - RENAUX - Sur l'homogénéisation des crachats tuberculeux et la recherche du bacille de Koch dans le pus d'abcès froids et d'adénites suppurées et dans les urines. C.R. Soc. Biol. 1921 t. 84 - p. 833.
- 38 - RONCHESE (A.D.) - Méthode rapide et sensible de recherche par homogénéisation des bacilles de Koch dans les crachats. C.R. Soc. Biol. 1924 t. 40 p. 9.
- 39 - SABRAZES (J.) - Bacilles de Koch des crachats tuberculeux autolysés en vase clos. C.R. Soc. Biol. 1922 t. 87 - p. 1281.
- 40 - SARTORY (A.) et MEYER (J.) - Technique d'isolement et de caractérisation d'une lipase des bacilles alcool-acido-résistants. Bull. Acad. Méd. 1947 - t. 131 - p. 243 et Presse méd. 1947 - N° 25 - p. 285.
- 41 - SARTORY (A.), MEYER (J.) et LANGE (J.M.A.) - Préparation de différentes lipases pancréatiques et leur influence sur les propriétés morphologiques et cultures des bacilles acido-résistants. Bull. Acad. Méd. 1947 - t. 131 - p. 19.
- 42 - SCHULTE - TIGGES - Zur Tüberkelbazillenfarbung. Deutsch. Med. Woch. 1920 - t. 55 - N° 44 - p. 1225
- 43 - SEDALIAN (P.) et BERTOYEE (A.) et CARRAZ (R.) - Homogénéisation des crachats et exsudats pathologiques par la digestion papaïnique en vue de la recherche du bacille de Koch. Ann. Inst. Pasteur, 1947 - t. 73 - p. 398/399.
- 44 - SPENGLER (K.) - Neue Farbe Methoden Für Perleucht und Tüberkelbazillen. Deutsch. Med. Woch. 1907 t. 33 N° 9 - p. 337.
- 45 - SPENGLER (K.) - Pankreatinverdanung des Sputums zum Sedimentiren der Tüberkelbazillen. Deutsch. Med. Woch. 1895 - t. 21 - N° 15 - p. 244.
- 46 - STEICH et PIETSCH - Über eine für den prastischen Arstverwandbare Anreicherungs-methode der Kochschen Bazillen im Sputum. Med. Klin. 1922 - t. 18 n° 39 - p. 1256.
- 47 - TECON - Recherche du bacille de Koch dans les expectorations. Thèse Doct. Genève 1911.

- 48 - TERCINET (M.) - Etude sur l'homogénéisation des crachats pour la recherche du bacille de KOCH. Thèse Doct. Pharm. Fac. Lyon - 1925.
- 49 - UHLENHUT (P.) - Uber Neuere methoden der Sputumuntersuchung. Deutsch. Med. Woch. 1909 - t. 50 - N° 23 p. 1047.
- 50 - VAUDREMER (A.) - Formes filtrantes des bacilles tuberculeux. C.R. Soc. Biol. 1923 - t. 89 - p. 80/82.
- 51 - VESSEREAU (A.) - La Statistique - Que Sais-je ? Presses Universitaires - éd. N° 281 - p. 44.
- 52 - WEISS - Uber eine neue Farbungsmethode der Tuberkelbacillus. Zeitschrift für Tuberkulose 1919 - t. 30 p. 330.
- 53 - WISSMER (B.) - La méthode d'Osol dans la recherche des bacilles de Koch. Presse méd. 1947 N° 16 - p. 181
-

